



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

IMPLEMENTAÇÃO DO PLANO DE ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE DOS PEQUENOS
RUMINANTES NA DIVISÃO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE VILA REAL

JOÃO FILIPE PERDIGÃO SILVA ROMERO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

CO-ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro

Raposo Pina Nunes

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

IMPLEMENTAÇÃO DO PLANO DE ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE DOS PEQUENOS
RUMINANTES NA DIVISÃO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE VILA REAL

JOÃO FILIPE PERDIGÃO SILVA ROMERO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

CO-ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro

Raposo Pina Nunes

2018

LISBOA

RESUMO

Implementação do Plano de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes na Divisão de Alimentação e Veterinária de Vila Real

A brucelose dos pequenos ruminantes (BPR) é uma das zoonoses de maior importância em Portugal e, especialmente, em Trás-os-Montes. Além da sua importância na saúde pública, a BPR tem implicações socioeconómicas significativas relacionadas com a produção ovina e caprina.

Por forma a promover o controlo e erradicação da BPR em Portugal foi implementado em 1991 o Plano de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes (PEBPR), contudo a erradicação da doença ainda não foi alcançada.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a implementação do PEBPR numa área de Trás-os-Montes e estudar as características e fatores de risco associados à BPR numa amostra de conveniência de 88 explorações, através de estudo observacional transversal analítico com inquérito aos produtores.

As explorações, onde os produtores tinham em média acima dos 50 anos, eram maioritariamente de ovinos de carne criados em sistema semi-extensivo. As explorações negativas tinham em média cerca de 60 animais e as positivas cerca de 105.

Para triagem das variáveis utilizadas num modelo de regressão logística múltipla foi realizada análise univariada. As variáveis significativas à análise univariada foram incluídas no modelo, que identificou o tamanho do rebanho e a prática de irregularidades na aplicação do programa e no cumprimento das regras de identificação e movimentação animal como fatores determinantes na ocorrência de infeção.

Concluiu-se a necessidade de reforço da colaboração e comunicação transparente entre os intervenientes no PEBPR, para a promoção da sua adequada execução, e da introdução de medidas no PEBPR que contemplem o controlo dos fatores de risco identificados.

Palavras-chave: brucelose dos pequenos ruminantes; *Brucella*; zoonose; epidemiologia; fatores de risco.

ABSTRACT

Implementation of the Small Ruminant Eradication Programme at Vila Real Division of Food and Veterinary

Small ruminant brucellosis (SRB) is one of the most important zoonosis in Portugal and especially in Trás-os-Montes. In addition to its importance regarding public health, SRB has significant socioeconomic implications related to small ruminant production.

In order to promote the control and eradication of SRB in Portugal, the Small Ruminant Brucellosis Eradication Programme (SRBEP) has been implemented in 1991, but the disease eradication has not yet been achieved.

The present work aimed to evaluate the implementation of the SRBEP in an area of Trás-os-Montes and study the characteristics and risk factors associated with SRB in a convenience sample of 88 small ruminant farms, through an observational cross-sectional analytical study and epidemiological inquiry to the producers.

Most of the farms had sheep destined to meat production reared in a semi-extensive production system. The farmers were on average over 50 years old. The flocks negative to SRB had an average of around 60 animals and the positive flocks around 105.

For the screening of variables used in a multiple logistic regression model, univariate analysis was performed. Significant variables to the univariate analysis were included in the model, which identified the size of the flock and the practice of sanitary irregularities as determinant factors for the occurrence of infection.

This study suggested the need to reinforce the collaboration and transparent communication between SRBEP stakeholders, in order to promote its proper implementation, and to introduce measures in the SRBEP that address the control of the identified risk factors.

Keywords: small ruminant brucellosis; *Brucella*; zoonosis; epidemiology; risk factors.

Índice

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xii
Lista de siglas e abreviaturas.....	xv
Capítulo 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular.....	3
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. História e importância da brucelose.....	4
2.2. Descrição do agente etiológico <i>Brucella</i> sp	5
2.2.1. Taxonomia das espécies e biovars de <i>Brucella</i>	5
2.2.2. Morfologia e identificação	6
2.2.3. Virulência	7
2.3. Patogénese e resposta imunitária	8
2.3.1. Fases da infeção.....	9
2.3.2. Resposta imune	10
2.3.3. Imunidade humoral	10
2.3.4. Imunidade celular.....	11
2.4. Quadro clínico	11
2.4.1. Lesões <i>post-mortem</i> causadas por <i>B. melitensis</i>	12
2.5. Epidemiologia.....	13
2.5.1. Distribuição geográfica e prevalência global de brucelose	13
2.5.2. Transmissão	14
2.6. Controlo e erradicação da brucelose	19
2.6.1. Evolução histórica do controlo da BPR em Portugal	19
2.6.2. Organização, supervisão e implementação do PEBPR em Portugal.....	20
2.6.3. Fundamentos dos programas de controlo e erradicação de BPR	21

2.6.4. Medidas aplicadas no controlo e erradicação da BPR em Portugal	22
2.7. Situação sanitária da BPR em Portugal.....	28
2.7.1. Fatores de risco e dificuldades técnicas identificados na aplicação do PEBPR.....	28
2.7.2. Brucelose humana em Portugal	29
2.7.3. Evolução da prevalência e incidência da BPR em Portugal	30
Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Execução das atividades de campo do PEBPR.....	33
3.2. Identificação de fatores de risco através de Inquérito epidemiológico (IE).....	34
3.2.1. Preparação e implementação do IE	34
3.2.2. Representatividade da amostra.....	34
3.2.3. Dados demográficos, sanitários e laboratoriais	35
3.2.4. Plataformas de gestão de recursos e saúde animal	36
3.2.5. Gestão e processamento dos dados	37
Capítulo 4. RESULTADOS	45
4.1. Avaliação das atividades de saneamento.....	45
4.1.1. Atuação das OPP e Serviços Oficiais.....	45
4.1.2. Caracterização do manejo das explorações.....	46
4.1.3. Caracterização dos contactos com outros animais.....	47
4.1.4. Cooperação dos proprietários das explorações	48
4.1.5. Práticas de risco para a transmissão da brucelose	49
4.1.6. Irregularidades sanitárias observadas.....	50
4.1.7. Perspetivas dos proprietários relativamente às irregularidades sanitárias praticadas e conhecimentos sobre brucelose.....	52
4.2. Estudo dos fatores de risco ao nível da exploração.....	54
4.2.1. Comparação entre a amostra do estudo e os dados populacionais	54
4.2.2. Caracterização dos efetivos pecuários da amostra	55
4.2.3. Análise das variáveis demográficas e sanitárias	60
4.2.4. Análise dos fatores de risco identificados no inquérito epidemiológico.....	69

Capítulo 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	83
5.1. Avaliação das atividades de saneamento.....	83
5.1.1. Práticas de biossegurança.....	83
5.1.2. Vacinação.....	84
5.1.3. Identificação eletrónica	85
5.1.4. Registos de existências	86
5.2. Estudo dos fatores de risco ao nível da exploração.....	87
5.2.1. Dimensão do rebanho.....	88
5.2.2. Espécies constituintes do efetivo	88
5.2.3. Reconhecimento da ocorrência de casos de BPR no efetivo	89
5.2.4. Venda de animais do efetivo	89
5.2.5. Partilha de pastagens com outros rebanhos	90
5.2.6. Contacto dos efetivos com espécies silváticas.....	91
5.2.7. Contacto entre efetivos de pequenos ruminantes	92
5.2.8. Contacto próximo dos efetivos com cães.....	93
5.2.9. Observação da prática de irregularidades sanitárias na exploração.....	94
5.3. Conclusões	94
Bibliografia.....	97
ANEXOS.....	101
Anexo I – Distribuição geográfica de <i>B. melitensis</i> entre 2016 e 2017	101
Anexo II – Classificação e fluxograma dos estatutos sanitários oficiais para BPR em Portugal	102
Anexo III – Prevalências de brucelose em Portugal.....	104
Anexo IV – Modelo do inquérito epidemiológico utilizado no estudo.....	105
Anexo V – Comparação entre explorações positivas, negativas e duvidosas.....	111
Anexo VI – Testes de sensibilidade para categorização das variáveis quantitativas em estudo	116
Anexo VII – Fatores de risco e níveis considerados para as variáveis em estudo	119

Anexo VIII – Comparação entre modelos de regressão logística e seleção do modelo explicativo	121
Anexo IX – Registo fotográfico da execução das atividades de campo do PEBPR, fatores de risco para a BPR e manejo das explorações	124
Anexo X – Mapas dos concelhos com explorações visitadas	130
Anexo XI – Distribuição das explorações visitadas por freguesia	133
Anexo XII – Resultados complementares da análise das variáveis quantitativas.....	135
Anexo XIII – Mapas de prevalência e incidência de BPR em Espanha (2015)	141

Índice de Figuras

Figura 1. Casos notificados de brucelose humana em Portugal e na ARS Norte entre 2013 e 2017.	30
Figura 2. Prevalências de BPR em explorações e animais em Portugal continental entre 2008 e 2017.	31
Figura 3. Prevalências de BPR em explorações e animais na região da DSAVR Norte entre 2011 e 2017.....	32
Figura 4. EDK da dimensão dos rebanhos, para a população de explorações de pequenos ruminantes de Chaves e amostra de explorações visitadas em Chaves.	54
Figura 5. Mapa das freguesias dos concelhos de Chaves, Valpaços e Boticas, indicando a georreferenciação das explorações de pequenos ruminantes visitadas (amostra) e do mercado de gado.....	58
Figura 6. Mapa das freguesias dos concelhos de Chaves, Valpaços e Boticas, ilustrando a percentagem de explorações de pequenos ruminantes visitadas, de cada grupo de classificação positiva ou negativa, em cada freguesia analisada.	59
Figura 7. EDK da idade dos proprietários dos efetivos da amostra, entre os grupos de classificação positiva e negativa.	60
Figura 8. EDK da dimensão dos rebanhos da amostra de explorações, entre os grupos de classificação positiva e negativa.	61
Figura 9. EDK da percentagem de animais de reposição no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa	62
Figura 10. EDK da percentagem de machos no efetivo, entre os grupos de classificação positiva e negativa	62
Figura 11. EDK da percentagem de animais identificados eletronicamente no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa.....	63
Figura 12. EDK da idade (meses) dos animais da amostra não identificados eletronicamente (eID).	64
Figura 13. EDK da percentagem de animais introduzidos no efetivo (amostra) por compra, entre os grupos de classificação positiva e negativa.....	65
Figura 14. Histograma da distribuição das idades declaradas dos animais (grupo de animais vacinados da amostra), em classes de meses, no momento da administração da vacina Rev.1.	66
Figura 15. EDK da percentagem de animais vacinados no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa	67
Figura 16. EDK da idade (meses) dos animais não vacinados (amostra).	67

Figura 17. Histograma do número de animais (amostra) por ano de nascimento, entre os grupos de diferente estatuto vacinal..	68
Figura 18. Distribuição mundial de brucelose por <i>B. melitensis</i> entre 2016 e 2017	101
Figura 19. Fluxograma dos estatutos sanitários oficiais para BPR em Portugal	102
Figura 20. Cronologia dos casos de brucelose humana notificados em Portugal	104
Figura 21. Registo fotográfico de uma incorreta aplicação da vacina Rev.1	124
Figura 22. Registo fotográfico da tipologia de curral mais comum da amostra de explorações analisadas	124
Figura 23. Registo fotográfico de uma tipologia de curral observada e menos comum na amostra de explorações analisadas – pavilhão.	125
Figura 24. Registo fotográfico de uma tipologia de curral observada e menos comum na amostra de explorações analisadas – instalações rudimentares.	125
Figura 25. Registo fotográfico de um exemplo de más condições higiénicas no curral.	126
Figura 26. Registo fotográfico de uma fêmea com a sua cria recém-parida – possível contaminação do alimento do rebanho com o agente.	126
Figura 27. Registo fotográfico de um exemplo de uma fonte pública acessível e com frequência utilizada por diferentes espécies animais, entre estas os pequenos ruminantes da amostra analisada	127
Figura 28. Registo fotográfico de um dos casos observados de consumo de secundinas por parte dos cães das explorações visitadas.	127
Figura 29. Registo fotográfico de um dos casos observados de consumo de pequenos ruminantes mortos por parte dos cães das explorações visitadas	128
Figura 30. Registo fotográfico evidenciando parte de um osso de pequeno ruminante do qual o cão fotografado na Figura 26 se alimentava	128
Figura 31. Registo fotográfico de uma aplicação da vacina Rev.1 perante a ausência de uso de material de proteção pessoal por parte da pessoa que fazia a contenção do animal	129
Figura 32. Registo fotográfico de um caso observado de ingestão de fezes de pequenos ruminantes, por parte de um cão da mesma exploração.	129
Figura 33. Mapa do concelho de Chaves e suas freguesias.	130
Figura 34. Mapa do concelho de Valpaços e suas freguesias.	131
Figura 35. Mapa do concelho de Boticas e suas freguesias.	132
Figura 36. Gráfico quantil-quantil da variável ‘percentagem de animais identificados eletronicamente no rebanho’.	138
Figura 37. Gráfico quantil-quantil da variável ‘idade do proprietário’.	138

Figura 38. Representação geográfica dos valores de incidência de BPR em animais nas comarcas espanholas, no ano 2015.	141
Figura 39. Representação geográfica dos valores de prevalência de BPR em rebanhos nas comarcas espanholas, no ano 2015.	142

Índice de Tabelas

Tabela 1. Critérios para a atribuição de classificação para a BPR às explorações do conjunto amostral do presente estudo.....	41
Tabela 2. Descrição quantitativa inicial da amostra de explorações de pequenos ruminantes visitada, agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.	41
Tabela 3. Esquema representativo das combinações de grupos de explorações comparadas através do teste de Fisher, para reclassificação das explorações duvidosas.	42
Tabela 4. Descrição quantitativa das características da amostra animal analisada.....	55
Tabela 5. Descrição quantitativa final da amostra de explorações de pequenos ruminantes visitada, agrupadas por classificação de BPR do estudo.	56
Tabela 6. Descrição da constituição dos diferentes tipos de rebanhos analisados, por espécie e aptidão produtiva.	56
Tabela 7. Descrição quantitativa das intervenções de vacinação (com a vacina Rev.1) e de identificação eletrónica aplicadas de forma devida ou indevida aos pequenos ruminantes da amostra estudada.	64
Tabela 8. Descrição estatística das variáveis quantitativas, demográficas e sanitárias, agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.	68
Tabela 9. Descrição estatística das variáveis quantitativas, demográficas e sanitárias, ao nível do animal.....	69
Tabela 10. Resultados das questões de caracterização da exploração, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.	71
Tabela 11. Resultados das questões de caracterização do efetivo animal, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.	75
Tabela 12. Resultados das questões de caracterização do manejo da exploração, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.	76
Tabela 13. Resultados das questões de caracterização do proprietário da exploração, dos IE realizados aos mesmos; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo. .	78
Tabela 14. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio das variáveis demográficas e sanitárias categorizadas e questões dos 88 IE caracterizadoras de risco para a transmissão de BPR.	81

Tabela 15. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo resultante da estratégia de redução por eliminação regressiva, aplicada ao modelo global.....	82
Tabela 16. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.	111
Tabela 17. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações duvidosas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.	112
Tabela 18. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o grupo das explorações duvidosas.	113
Tabela 19. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o conjunto das explorações negativas e duvidosas.	114
Tabela 20. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o conjunto das explorações positivas e duvidosas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.	115
Tabela 21. Comparação da significância dos níveis de categorização das variáveis quantitativas, para melhor diferenciação entre explorações positivas e negativas.	116
Tabela 22. Especificação dos níveis e fatores de risco das variáveis significativas ao teste de Fisher e variáveis quantitativas categorizadas em qualitativas, agrupados por classificação de BPR do presente estudo. Critérios utilizados na categorização das variáveis quantitativas em qualitativas.....	119
Tabela 23. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo completo, contemplando as variáveis significativas ao teste de Fisher e Odds-ratio.	121
Tabela 24. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo global, contemplando as variáveis cujo sentido epidemiológico poderia justificar a presença de risco para a transmissão de BPR.	122
Tabela 25. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo resultante da estratégia de redução por eliminação regressiva, aplicada ao modelo reduzido.	122

Tabela 26. Comparação entre características dos modelos criados – número de variáveis, diferenças de AIC e plausibilidade de cada modelo em comparação com o melhor modelo candidato.	123
Tabela 27. Distribuição da amostra de explorações visitadas por freguesia, agrupadas de acordo com a sua classificação de BPR do estudo.	133
Tabela 28. Resultados do teste-T de Student aplicado às variáveis quantitativas.	135
Tabela 29. Resultados dos testes de Shapiro-Wilk e de Wilcoxon-Mann-Whitney aplicados às variáveis quantitativas.	136
Tabela 30. Resultados do teste-T de Student, aplicado à variável ‘tamanho do rebanho’, considerando grupos de explorações de acordo com certas variáveis em estudo.	139
Tabela 31. Resultados dos testes de Shapiro-Wilk e de Wilcoxon-Mann-Whitney aplicados à variável ‘tamanho do rebanho’, considerando grupos de explorações de acordo com certas variáveis em estudo.	140

Lista de siglas e abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AIC – *Akaike Information Criterion* ou Critério de Informação de Akaike

Δ AIC – Diferença dos Critérios de Informação de Akaike

ARS – Administração Regional de Saúde

AUC – *Area Under the Curve* ou Área Sob a Curva

BPR – Brucelose dos Pequenos Ruminantes

B2.1 – Estatuto sanitário: efetivo não indemne em que tenha sido isolada *Brucella* spp.

B2 – Estatuto sanitário: efetivo não indemne de brucelose

B3.S – Estatuto sanitário: efetivo em que tenha sido suspenso o estatuto de indemne

B3 – Estatuto sanitário: efetivo indemne de brucelose

B4.S – Estatuto sanitário: efetivo em que tenha sido suspenso o estatuto de oficialmente indemne

B4 – Estatuto sanitário: efetivo oficialmente indemne de brucelose

CAOP – Carta Administrativa Oficial de Portugal

CEE – Comunidade Económica Europeia

DAV – Direção de Alimentação e Veterinária

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DRATM – Direção Regional de Alimentação de Trás-os-Montes

DSAVR – Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional

DSPA – Direção de Serviços de Proteção Animal

EDK – Estimativa de Densidade Kernel

eID – Identificação eletrónica

FC – Fixação do Complemento

FPSR – Reação Serológica Falso-Positiva

GPS – *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamento Global)

IC – Intervalo de Confiança

IE – Inquérito Epidemiológico

IFAP – Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

Ig – Imunoglobulinas

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LPS – Lipopolissacarídeo

NA – Não aplicável (valor não atribuído)

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OPP – Organização de Produtores Pecuários

OR – *Odds-ratio*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDF – *Portable Document Format*

PEBPR – Plano de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes

PISA.net – Programa Informático para a Saúde Animal

Q-Q – Quantil-Quantil

RAM – Região Autónoma da Madeira

RB – Rosa de Bengala

SE – Erro-padrão

SIRCA – Sistema de Recolha de Cadáveres de Animais Mortos na Exploração

SNIRA – Sistema Nacional de informação e Registo Animal

SRB – *Small Ruminant Brucellosis*

SRBEP – *Small Ruminant Brucellosis Eradication Programme*

UE – União Europeia

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma doença infecciosa, causada por bactérias do género *Brucella*, que afeta uma grande variedade de mamíferos de espécies domésticas, silváticas e também humanos. Nos animais de produção a doença apresenta uma morbilidade elevada em efetivos sem contacto prévio com o agente, contudo apresenta baixa mortalidade (Spickler, 2009a).

A brucelose dos pequenos ruminantes (BPR) é uma doença altamente transmissível e é classificada como uma antropozoonose – uma doença que é transmitida principalmente dos animais para humanos (Paulin, 2003) – exceto no caso da infeção por *Brucella ovis*, pois este agente não é patogénico para humanos (European Commission, 2001). Em ovinos e caprinos a brucelose é causada sobretudo por *Brucella melitensis*.

A infeção é quase invariavelmente transmitida ao hospedeiro humano por contacto direto ou indireto com animais infetados e os seus produtos, usualmente como consequência de exposição ocupacional ou ingestão de produtos lácteos contaminados. Em humanos, afeta indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos, causando uma doença debilitante e por vezes crónica (Corbel, 2006; Spickler, 2009b).

Esta doença é importante para a saúde pública e causa elevadas perdas económicas no setor da produção animal, resultantes da doença clínica, abortos, perdas neonatais, fertilidade reduzida, redução da produção leiteira, assistência veterinária, abates sanitários dos animais infetados e a sua substituição no efetivo. Adicionalmente, a doença é um impedimento ao livre-trânsito de animais e à sua exportação (Al-Majali, 2005; Coelho, Coelho, Roboredo, & Rodrigues, 2007).

Por forma a mitigar os impactes referidos, a maioria dos países tem procurado aplicar os recursos necessários para erradicar a brucelose nas populações de animais domésticos. Para esse propósito, foram desenvolvidos programas de controlo que utilizam dois métodos principais: a vacinação de animais jovens e adultos e o abate de animais expostos e infetados pelo agente (com base na reação de testes serológicos) (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007).

Em resultado dos programas de controlo e erradicação, vários países da União Europeia (UE) erradicaram a doença com sucesso das populações bovinas e de pequenos ruminantes. Em locais onde a doença ainda não foi eliminada dos ruminantes domésticos ainda são reportados vários casos de brucelose humana por ano. Em países livres da doença são reportados casos de brucelose humana contraídos no estrangeiro (European Food Safety Authority [EFSA] & European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2016).

Em Portugal, a brucelose dos ovinos e caprinos é uma das mais importantes zoonoses e a sua declaração às autoridades veterinárias é obrigatória (Decreto Lei n.º 39209, de 14 de Maio de 1953). Desde 1953, têm sido aplicadas, em Portugal, medidas de controlo para evitar a disseminação da doença e em 1992 o programa oficial de erradicação é posto em prática e tem-no sido, com os necessários ajustes, até à data (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2018). Não obstante, a erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes ainda não foi alcançada por vários motivos (DGAV, 2018), o que poderá indicar que as medidas de controlo adotadas poderão não ser suficientes ou que é necessário um melhor conhecimento da dinâmica da doença nas populações animais, dada a complexidade da sua epidemiologia (Coelho et al., 2007).

Vários estudos têm sido realizados ao longo dos anos, contemplando a epidemiologia desta doença e os fatores de risco que contribuem para o insucesso da erradicação da BPR em Portugal, os quais identificam principalmente a complexa rede de contactos entre rebanhos de pequenos ruminantes e a deficiente implementação das medidas preconizadas no programa de erradicação em curso, em algumas zonas (Gonçalves, 1993; Vaz, 1996; Martins, 2001; Coelho, 2007). Assim, torna-se importante avaliar periodicamente os fatores de risco para a transmissão da BPR como contributo para a identificação das causas do insucesso da erradicação desta doença e para a promoção dos ajustamentos ao programa.

O presente estudo tem como objetivo contribuir para a avaliação da aplicação do Programa de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes (PEBPR) em Trás-os-Montes, a zona do País mais afetada por esta doença, através do acompanhamento e avaliação de atividades de saneamento realizadas pelas Organizações de Produtores Pecuários (OPP) e serviços veterinários oficiais (Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região Norte – DSAVR Norte) e um estudo de fatores de risco ao nível da exploração, baseado em inquérito aos produtores.

Assim, para introdução aos temas do trabalho é apresentada no Capítulo 2 uma revisão bibliográfica sobre a brucelose e os seus fatores de risco, no Capítulo 3 são referidas as metodologias aplicadas, no Capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos e finalmente o Capítulo 5 apresenta a discussão dos resultados e conclusões do presente trabalho.

1.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O presente estudo foi realizado no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O estágio teve lugar entre novembro de 2014 e fevereiro de 2015 e as principais atividades desenvolvidas foram as seguintes:

- Visita a 88 explorações de pequenos ruminantes de 3 concelhos do distrito de Vila Real, sua georreferenciação, produção de relatório da visita e realização de inquéritos epidemiológicos (IE) aos proprietários das mesmas;
- Acompanhamento e colaboração nas intervenções sanitárias realizadas pela Organização de Produtores Pecuários (OPP) local junto dos rebanhos de pequenos ruminantes destas explorações, nomeadamente vacinação, desparasitação, identificação e colheita de amostras de sangue para rastreio serológico de BPR;
- Acompanhamento das recolhas – realizadas pela Direção de Alimentação e Veterinária (DAV) de Vila Real – de ovinos e caprinos suspeitos, reagentes ou positivos à BPR, destinados a abate sanitário;
- Recolha (a partir das bases de dados ao serviço da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária – DGAV) e análise dos dados demográficos, sanitários e laboratoriais referentes aos animais e explorações da amostra estudada.

O trabalho de campo desenvolvido localmente durante o período de estágio curricular foi fundamental para o apuramento da dinâmica dos sistemas de produção de ovinos e caprinos em Trás-os-Montes e da aplicação das medidas previstas no PEBPR.

Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História e importância da brucelose

Historicamente, a brucelose tem sido referida como febre ondulante, febre de Gibraltar, febre mediterrânea, febre de Malta – em humanos, e doença de Bang, ou aborto contagioso, em animais (Solera & Castaño, 2008).

A brucelose é uma doença há muito reconhecida – existem inclusivamente referências bíblicas a uma doença que causava abortos em animais, uma característica típica da brucelose (Boschioli, Foulongne, & O'Callaghan, 2001; Nicoletti, 2010).

As manifestações clínicas da brucelose humana foram descritas como “febre gástrica mediterrânea remittente”, pela primeira vez em 1859 por Marston, um médico do exército britânico, quando este trabalhava na ilha de Malta. Em 1887, foi descoberto o agente causador da febre de Malta, por Sir David Bruce, que lhe deu o nome de *Micrococcus melitensis*. Este foi isolado do baço de um soldado que havia morrido, vítima desta doença. Dez anos mais tarde, Almroth Wright desenvolveu um método de diagnóstico para a febre de Malta, através da aglutinação entre antigénio e anticorpos presentes no soro do paciente. Em 1905, foi feito o primeiro isolamento de *Brucella* em sangue de caprino, por Zammit. A natureza zoonótica da doença foi demonstrada pelo major William Horrocks (que também era membro da Comissão da Febre Mediterrânea), que encontrou o agente em leite (Solera & Castaño, 2008).

Bernhard Bang, um médico e veterinário dinamarquês, descobre, em 1897, *Brucella abortus* enquanto investigava os casos de abortos contagiosos que afetavam o gado bovino na Dinamarca há mais de um século. Bang descobriu também que o organismo em questão também afetava cavalos, ovelhas e cabras, razão pela qual a doença ficou conhecida como “doença de Bang” (Solera & Castaño, 2008).

Em 1920, foi descoberta a ligação entre a infeção por este agente nos bovinos e em humanos por Alice Evans, uma bacteriologista americana, que deu o nome de *Brucella* ao género, em honra de Bruce. A morfologia e patologia do organismo era bastante similar entre o *Bacterium abortus* de Bang e o *Micrococcus melitensis* de Bruce (Solera & Castaño, 2008).

B. ovis foi isolada, em 1953, a partir de carneiros com epididimite, na Nova Zelândia e Austrália. *B. canis* foi descoberta em 1966, em cães, caribus e renas. Em 1994, foi descrita a primeira estirpe de *Brucella* isolada a partir de um feto abortado de golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*). Desde então, várias estirpes de *Brucella* têm vindo a ser isoladas a partir de mamíferos marinhos (Solera & Castaño, 2008).

Com a exceção de alguns países, onde foi alcançada a erradicação da doença através de rigorosas medidas veterinárias de carácter higiossanitário, a brucelose representa um grande

problema a nível global e é endémica em vastas áreas do globo (Anexo I – Figura 18). Nestes locais, a brucelose humana é extremamente comum e quando acompanhada de um diagnóstico e tratamento deficientes, pode dar origem a complicações sérias que, por vezes, colocam o paciente em risco de vida (Boschioli et al., 2001). A erradicação da brucelose em animais é um passo fundamental no controlo da doença em humanos (Food and Agriculture Organization [FAO], World Organisation for Animal Health [OIE], World Health Organization [WHO], 2006), razão pela qual a redução na incidência de brucelose humana é francamente bem sucedida apenas quando a intervenção veterinária é também bem sucedida (Nicoletti, 2010).

Para proteger a saúde pública, reduzir as perdas em produção animal devido à doença clínica, abortos, mortes neonatais, fertilidade reduzida e produção leiteira reduzida e com vista a alcançar um estatuto livre de doença, os governos de vários países têm implementado programas de vigilância e controlo, que são extremamente dispendiosos. Por exemplo, fontes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América estimam que nos anos 90 cerca de 150 milhões de dólares foram investidos em tais iniciativas (Boschioli et al., 2001). Os principais custos destes programas são relativos ao trabalho de campo para recolha de amostras, ao diagnóstico laboratorial, aos custos de vacinas e aos fundos aplicados em indemnizações aos proprietários dos animais sujeitos a abate sanitário.

2.2. Descrição do agente etiológico *Brucella* sp

2.2.1. Taxonomia das espécies e biovars de *Brucella*

Brucella é um membro da classe das α -Proteobactérias. Este género é geralmente dividido em seis espécies, com base na preferência do hospedeiro mamífero, fenótipo e genótipo e estas espécies variam em grau de virulência para os humanos (Foster, Osterman, Godfroid, Jacques, & Cloeckert, 2007; Solera & Castaño, 2008). As seis espécies “clássicas” são *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. As primeiras quatro espécies são normalmente observadas na forma lisa (*smooth* - S), enquanto que *B. ovis* e *B. canis* só foram descritas na forma rugosa (*rough* – R), expressando lipopolissacarídeo (LPS) R como o principal antígeno de superfície (Cloeckert, Verger, Grayon, & Vizcaíno, 1996; European Commission, 2001). Mais recentemente, foram reconhecidas e classificadas quatro novas espécies de *Brucella*: *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* e *B. inopinata* (Nicoletti, 2010).

Algumas espécies de *Brucella* dividem-se em biovars. *B. abortus* apresenta 9 biovars, *B. suis* tem 5 e *B. melitensis* tem 3 biovars (Solera & Castaño, 2008).

Cada espécie de *Brucella* encontra-se mais frequentemente associada a certos hospedeiros animais. *B. abortus* provoca brucelose normalmente em bovinos, bisontes e búfalos; *B.*

melitensis é a espécie mais importante em ovinos e caprinos, embora *B. ovis* também afete carneiros, causando infertilidade; *B. canis* provoca doença quase exclusivamente em cães; *B. neotomae* encontra-se em roedores, contudo não causa doença; *B. suis* contém isolados mais diversos do que qualquer outra espécie de *Brucella* e estes isolados têm uma especificidade mais alargada para o hospedeiro: os biovars 1-3 afetam suínos e a lebre europeia é reservatório para o biovar 2; o biovar 4 ocorre em renas e caribus; o biovar 5 afeta roedores (Spickler, 2009). *B. ceti* afeta cetáceos e *B. pinnipedialis* afeta pinípedes; *B. microti* foi isolado em ratazana e *B. inopinata* de um paciente humano (Blasco, 2010).

Ao nível do Ácido Desoxirribonucleico (ADN), vários métodos de genotipagem molecular indicam que todas as espécies de *Brucella* partilham um elevado grau de similaridade – as diferentes espécies dos animais terrestres apresentam uma homologia superior a 90% em ensaios de hibridação ADN-ADN – e foi inclusivamente sugerido, de forma controversa, que se trata de um género monoespecífico, contemplando uma espécie única, *B. melitensis* e restantes espécies como biovars (Boschiroli, Foulongne, & O’Callaghan, 2001; Solera & Castaño, 2008). A hibridação ADN-ADN foi também aplicada a estirpes representativas de *Brucella* de mamíferos marinhos, mostrando que estas estão relacionadas com as seis espécies clássicas de *Brucella*, uma vez que existe uma homologia superior a 77% ao nível do ADN (Foster et al., 2007).

O interesse nos genes *omp* (*outer membrane protein*) de *Brucella* reside no facto de estes exibirem polimorfismo suficiente para permitir a diferenciação entre as espécies, biovars e estirpes de *Brucella*. Os marcadores polimórficos identificados trouxeram novos conhecimentos a respeito do desenvolvimento evolucionário do género *Brucella* e novas expectativas na área de desenvolvimento de vacinas (Cloeckaert et al., 1996).

Em humanos, foi confirmada a infeção com *B. abortus*, *B. melitensis*, os biovars 1, 3 e 4 de *B. suis* e raramente *B. canis*, *B. suis* biovar 2 e estirpes isoladas de mamíferos marinhos, mas nunca com *B. ovis*, *B. neotomae* ou o biovar 5 de *B. suis*. As vacinas vivas também são patogénicas para humanos (Spickler, 2009).

2.2.2. Morfologia e identificação

As bactérias do género *Brucella* são cocobacilos aeróbios com comprimento compreendido entre os 0,6 e 1,5 µm e entre 0,5 a 0,7 µm de largura. Não têm motilidade, não são toxigenicas nem hemolíticas e não formam esporos, flagelos nem fímbrias. Não têm também a capacidade de produzir verdadeiras cápsulas (European Commission, 2001; Solera & Castaño, 2008). Encontram-se organizados individualmente e com menos frequência em pares

ou pequenos grupos. Com a exceção de formas pleomórficas, que poderão estar presentes em culturas antigas, a morfologia de *Brucella* é relativamente constante. Estas bactérias são Gram-negativas e normalmente não apresentam coloração bipolar. As espécies de *Brucella* são catalase-positivas e normalmente oxidase-positivas (Solera & Castaño, 2008).

A identificação de espécies de *Brucella* em cultura inclui um conjunto de 25 características fenotípicas, incluindo a serotipagem de antígenos A e M, fagotipagem, diferenças nas necessidades atmosféricas de CO₂ para o crescimento e processos metabólicos (tal como o grau de produção de urease, produção de H₂S, sensibilidade a corantes – fucsina básica e tionina – e aglutinação em soro) (European Commission, 2001; Solera & Castaño, 2008). As bactérias do género *Brucella* são sensíveis a uma grande variedade de antibióticos e as diferenças existentes ao nível da sensibilidade podem ser utilizadas para ajudar a diferenciar entre as estirpes vacinais e de campo. A estirpe vacinal Rev.1 é sensível a benzilpenicilina e resistente a estreptomicina (European Commission, 2001).

2.2.3. Virulência

A patogénese das espécies de *Brucella* depende sobretudo de 3 aspetos: estas espécies conseguem sobreviver, replicar-se e persistir dentro de células hospedeiras; têm a capacidade de evadir os mecanismos bactericidas celulares; conseguem modular a resposta imunitária do hospedeiro (Castaño et al., 2016).

O LPS de *Brucella* spp. é uma das moléculas chave envolvida na sua virulência. Tem um conjunto de propriedades notável, tal como a resistência à ligação com péptidos e proteínas antimicrobianas, baixa ativação do sistema complemento, reduzida estimulação de células que desencadeiam a rede de citocinas e baixa toxicidade para as células onde as bactérias crescem (Castaño et al., 2016). As estirpes de *Brucella* podem existir na forma lisa ou rugosa e as estirpes rugosas contêm menos ou nenhum LPS e são menos virulentas do que as estirpes lisas. Tal como outros organismos intracelulares, as espécies de *Brucella* resistem à destruição por neutrófilos após a fagocitose, tendo também a capacidade de se replicar dentro de compartimentos membranares existentes nos macrófagos e fagócitos. A sua capacidade de sobreviver e de se multiplicar dentro dos fagossomas do hospedeiro depende sobretudo da inibição da fusão fagolisossomal, através da rápida acidificação do fagossoma, após a entrada no mesmo (Solera & Castaño, 2008).

Utilizando técnicas moleculares, foram descritos vários fatores de virulência para as espécies de *Brucella*, sugerindo um papel crucial na sua sobrevivência intracelular. Alguns dos potenciais fatores de virulência descritos incluem várias proteínas induzidas pelo stress, proteínas de choque térmico, proteases e compostos associados à síntese de LPS (Solera & Castaño, 2008).

2.3. Patogénese e resposta imunitária

Do ponto de vista patogénico, a infeção de pequenos ruminantes por *B. melitensis* é semelhante à infeção por *B. abortus* em bovinos, apesar de algumas diferenças significativas (European Commission, 2001; Blasco, 2010).

As bactérias do género *Brucella* spp. são microrganismos intracelulares facultativos com tropismo para o sistema reticuloendotelial (European Commission, 2001; Blasco, 2010). As estirpes virulentas de *Brucella* spp. podem infetar tanto células fagocíticas como não fagocíticas. O mecanismo de invasão das células não fagocíticas não se encontra claramente estabelecido. No caso das células fagocíticas, *Brucella* spp. tende a localizar-se no reticulo endoplasmático rugoso, sendo que, no caso das células fagocíticas polimorfonucleares e mononucleares, recorre a numerosos mecanismos para evitar ou suprimir a resposta bactericida (European Commission, 2001; Blasco, 2010).

Os organismos do género *Brucella* têm tropismo para os seguintes tecidos: tecido trofoblástico placentar, pulmões fetais, macrófagos do sistema fagocítico monocitário, os aparelhos reprodutores feminino e masculino, linfonodos, articulações e úbere, que representa um importante local de predileção para *B. melitensis* (European Commission, 2001; Corbel, 2006; Radostits et al., 2007; Blasco, 2010; Coelho, Díez, & Coelho, 2014).

Em animais sexualmente maduros, a infeção localiza-se sobretudo no sistema reprodutor e produz tipicamente placentite seguida de aborto, nas fêmeas gestantes – geralmente durante o último terço da gestação – e orquite nos machos. No entanto, estas manifestações clínicas não são patognomónicas (Corbel, 2006). Após o aborto, a infeção uterina persiste até 5 meses e as glândulas mamárias e linfonodos associados mantêm-se infetados durante anos. A recuperação espontânea pode ocorrer, mas o curso normal da doença é o de infeção persistente (European Commission, 2001; Radostits et al., 2007). Não existe evidência de que as características clínicas ou epidemiológicas da infeção nos ruminantes possa ser variável consoante a estirpe (biovars) isolada (Blasco, 2010).

A gravidade da infeção por *Brucella* spp. varia significativamente consoante a espécie, estirpe e quantidade do inóculo. A suscetibilidade do hospedeiro pode também variar de acordo com o seu estado reprodutivo. Além disso, a imunidade vacinal pode modificar a relação parasito-hospedeiro. Assim sendo, podem ser observados no campo todos os estadios intermédios entre a infeção aguda típica e a resistência completa (European Commission, 2001).

A gravidade da doença é determinada por diversos fatores, como a vacinação prévia, a idade e sexo do hospedeiro, bem como condições de manejo, como a dimensão do rebanho e a densidade animal. Os abortos são mais frequentes em animais não vacinados, sendo também muito superior o número de organismos excretados por estes (Corbel, 2006).

2.3.1. Fases da infecção

No decurso da infecção por *B. melitensis*, podem ser identificadas 4 fases:

1) Penetração e migração local e regional

Ao inocular o hospedeiro, as formas bacterianas são confrontadas com as defesas celulares deste, capturadas e transportadas – na forma livre ou fagocitada – através dos ductos linfáticos até aos linfonodos mais próximos do ponto de entrada, onde a multiplicação bacteriana toma lugar (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014).

A infecção ocorre nesta fase, despoletando uma resposta imunitária caracterizada por resposta imunológica celular – principalmente macrófagos e linfócitos T – e resposta serológica ausente ou muito frustrada mediada por anticorpos específicos (Coelho et al., 2014). O resultado do processo infeccioso depende da espécie ruminante infetada, idade e condição imunológica do animal, possível gestação, bem como das características de virulência e proporção do inóculo (European Commission, 2001).

Caso o microrganismo permaneça nos linfonodos promove uma hiperplasia linforeticular que pode durar semanas a meses (Coelho et al., 2014).

2) Disseminação hematogénea

Caso o agente não permaneça nos linfonodos e subsista às defesas do hospedeiro é transportado através dos ductos linfáticos e posteriormente disseminado por via hematogénea, estabelecendo-se uma bacteriemia. Esta bacteriemia é detetável após 10 a 20 dias e persiste entre 30 dias a mais de 2 meses. Desta forma, a bactéria alcança virtualmente todos os órgãos, incluindo o sistema monocítico-macrofágico (fígado, baço, linfonodos e medula óssea), útero e órgãos reprodutivos (útero gravídico, testículos, vesículas seminais, glândulas mamárias, etc.), causando bacteriemias recorrentes acompanhadas de febre, que estão diretamente correlacionadas, nas fêmeas gestantes, com infecção placentar e fetal e consequente aborto (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014).

A invasão e proliferação uteroplacentária é muito significativa nas fêmeas gestantes, pelo que não se considera que estes órgãos providenciem uma resistência imunológica adequada. O tropismo especial de *B. melitensis* para o endométrio gravídico e placenta fetal é responsável pela sua principal manifestação clínica em ovelhas e cabras: aborto durante o último terço da gestação ou nascimento de feto com reduzida viabilidade (Coelho et al., 2014).

Caso a infecção ocorra no final da gestação, em geral não conduz a aborto. Nesta fase podem observar-se outros sinais relativos à localização da infecção por *Brucella*: orquite, epididimite, higroma, artrite, metrite, mastite subclínica, etc. No entanto, vários animais desenvolvem infecção autolimitada ou tornam-se portadores assintomáticos e potenciais excretores (European Commission, 2001).

3) Fase secundária ou de adaptação

Durante a terceira fase da infeção a sua evolução depende da suscetibilidade do hospedeiro e caracteriza-se pela presença de bactérias em localizações específicas como a placenta, glândulas mamárias, testículos, articulações, etc. com respetiva sintomatologia acompanhante. Esta fase pode caracterizar-se tanto pela eliminação de *Brucella* ou, mais frequentemente, pela infeção persistente das glândulas mamárias e linfonodos supramamários e genitais, com excreção do agente de forma constante ou intermitente no leite e secreções genitais (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014) .

4) Fase de cura espontânea ou de doença latente

Em pequenos ruminantes o período infeccioso não é aparente, evoluindo para uma situação de infeção latente ou de cura espontânea – sendo esta frequente em ovelhas e cabras até 2 anos de idade – contudo este fenómeno é discutível (Coelho et al., 2014).

2.3.2. Resposta imune

Em geral, os mecanismos imunitários tanto humorais como celulares são ativados após a infeção por *Brucella*. A magnitude e duração destas respostas é afetada por vários fatores, incluindo a virulência da estirpe infetante, a proporção do inóculo, a espécie do hospedeiro, idade, sexo, fase da gestação e condição imunitária (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014).

2.3.3. Imunidade humoral

Pode esperar-se uma resposta serológica cerca de 2 a 4 semanas após a infeção por exposição natural, contudo a resposta é variável e pode estar ausente de todo. A invasão do útero grávidico pode causar uma elevação marcada e persistente de anticorpos, porém isto pode também ocorrer apenas após a ocorrência de aborto ou parto de termo. A invasão do úbere lactante causa uma resposta serológica menos marcada, dado que as bactérias se encontram confinadas a um número limitado de linfonodos, o que pode fazer com que ocorra uma estimulação imunitária mínima ou que esta não tenha lugar de todo (European Commission, 2001).

A informação disponível sugere que o padrão da resposta serológica, no que diz respeito à produção de imunoglobulinas em ovelhas e cabras, é muito semelhante à dos bovinos, i.e., incremento inicial de imunoglobulinas (Ig) M nas primeiras 3 a 4 semanas, seguido de um incremento gradual de IgG e IgA 7 a 14 dias após a infeção, com descida dos isotipos para níveis reduzidos num estadio de cronicidade mas com predomínio de IgG (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014).

A resposta humoral contra a infecção por *Brucella* é transitória e muitas vezes ausente em animais jovens, sexualmente imaturos. É também relativamente ineficaz, uma vez que a forma lisa de *Brucella* spp. pode inibir a fusão fagossoma-lisossoma, aumentando a possibilidade de multiplicação dentro dos macrófagos num meio sem anticorpos (European Commission, 2001; Coelho et al., 2014).

A estirpe vacinal *B. melitensis* Rev.1, quando aplicada em dose completa por via subcutânea ou intraconjuntival em animais de reposição jovens, pode induzir uma resposta serológica de longa duração para testes de aglutinação, interferindo com o rastreio serológico. Não existem atualmente testes serológicos capazes de distinguir entre anticorpos derivados de infecção e de vacinação, dado que não foram identificadas, até à data, diferenças entre os antígenos de diagnóstico da estirpe de campo de *B. melitensis* e os da estirpe vacinal, respetivamente (European Commission, 2001).

2.3.4. Imunidade celular

A fase de declive da brucelose coincide com o início da imunidade celular no início da fase de latência. Após garantir entrada no organismo do hospedeiro, as bactérias encontram as defesas celulares deste. A resposta de imunidade celular, particularmente na forma de macrófagos ativados e linfócitos T, constitui o mecanismo principal do hospedeiro contra a infecção por *Brucella* e determina o destino das bactérias invasoras (Coelho et al., 2014; European Commission, 2001). Os fagócitos mononucleares constituem o fator mais importante da imunidade celular e a imunidade adquirida contra as bactérias intracelulares depende da resposta mediada pelas células T. Esta resposta é utilizada no teste alérgico da brucelina (Coelho et al., 2014).

A resposta celular, tal como a resposta humoral, pode ser esperada em algumas semanas mas esta é variável e pode não ser detetada (European Commission, 2001).

2.4. Quadro clínico

As principais manifestações clínicas da brucelose em ruminantes são aborto, infertilidade, orquite e epididimite. Tanto ovinos como caprinos, de ambos os sexos, com infecção por *B. melitensis* podem manifestar lesões artríticas, embora este tipo de lesões sejam sinais raros da infecção por este agente. Estes sinais são característicos, mas não específicos, isto é, não patognomónicos, de infecção por brucelose nos hospedeiros animais (Corbel, 2006; Spickler, 2009a; Blasco, 2010).

É também importante referir que não existe evidência de que os sinais clínicos de infecção por *B. melitensis* em ovinos e caprinos variem de acordo com o biovar em questão (Kaltungo, Saidu, Musa, & Baba, 2014).

A falha reprodutiva na fêmea adulta ocorre como resultado da localização do agente na placenta, o que ocasiona o desenvolvimento de placentite, com subsequente aborto, nados-mortos ou nascimentos prematuros e, em alguns casos, retenção placentária (Corbel, 2006; Radostits et al., 2007; Spickler, 2009a).

A interferência com a fertilidade é frequentemente temporária e a maioria dos animais infetados geralmente aborta apenas uma vez, habitualmente durante os últimos 2 meses de gestação. Contudo, a reinvasão do útero pelo agente ocorre nas gestações seguintes, com excreção do mesmo em fluídos e membranas fetais e com a maioria dos animais levando a gestação a termo. Em certas áreas, os abortos são inclusivamente pouco comuns (Corbel, 2006; European Commission, 2001). Por outro lado, muitas fêmeas não gestantes da espécie ovina e caprina mantêm-se assintomáticas após a infecção (Spickler, 2009a).

Alton (1990) verificou que os casos de aborto em cabras ocorriam entre 3 a 4 semanas após infecção experimental com elevadas doses de *B. melitensis*. Em ovelhas os casos de aborto ocorriam entre 4 a 12 semanas após infecção experimental como o mesmo organismo, o que indica que as ovelhas são relativamente mais resistentes (Alton, 1990, citado por Kaltungo, Saidu, Musa, & Baba, 2014).

Posteriormente à ocorrência de aborto ou parto prematuro, segue-se uma redução marcada na produção de leite. A infecção do úbere após um parto normal também resulta numa redução considerável na produção de leite. No entanto, raramente se detetam sinais clínicos de mastite. Com frequência o úbere mantém-se permanentemente infetado, especialmente em vacas e cabras e é recorrente a excreção constante ou intermitente do agente no leite das lactações seguintes (European Commission, 2001; Corbel, 2006).

No hospedeiro macho, infecções localizadas resultam em orquite ou epididimite aguda, no caso de *B. melitensis* e *B. ovis* e podem provocar infertilidade (Corbel, 2006; Spickler, 2009a).

A fase aguda da doença é caracterizada por reduzida qualidade do sémen e distensão do saco escrotal, pela acumulação de exsudados hemorrágicos ou fibrino-purulentos. Os principais achados são lesões palpáveis no epidídimo e túnicas. Estas infecções têm um curso crónico, resultando em estase seminal e formação secundária de espermatocelo, provocando assim infertilidade.

2.4.1. Lesões *post-mortem* causadas por *B. melitensis*

Os fetos de ruminantes abortados podem não apresentar lesões ou apresentar autólise ou diferentes graus de edema subcutâneo, bem como fluido sanguinolento nas cavidades

corporais. Nestes, os linfonodos, baço e/ou fígado podem apresentar-se hipertrofiados e os pulmões podem exibir pneumonia e pleurite fibrinosa (Spickler, 2009a; Kaltungo et al., 2014).

Posteriormente a situações de aborto afetando pequenos ruminantes, poderá ser observado placentite, endometrite moderada a grave e os cotilédones podem apresentar coloração vermelha, amarela ou mesmo sem alterações ou necróticos. A região intercotiledonar apresenta-se caracteristicamente semelhante a couro e com espessamento focal e exsudados na sua superfície (Spickler, 2009a; Kaltungo et al., 2014).

Animais adultos podem manifestar, em necrópsia, desde lesões inflamatórias granulomatosas a purulentas no trato reprodutivo, glândula mamária, linfonodos supramamários, outros tecidos linfoides, articulações e membranas sinoviais, ossos, e outros tecidos e órgãos. Posteriormente à ocorrência de aborto pode-se observar endometrite moderada a grave e os machos podem apresentar epididimite, orquite uni ou bilateral (tendo sido reportados casos de orquite necrosante), vesiculite seminal e prostatite (Spickler, 2009a, 2009b).

Os achados histológicos em infecções por brucelose consistem sobretudo em infiltrações linfocíticas e granulomas com necrose (Kaltungo et al., 2014).

2.5. Epidemiologia

2.5.1. Distribuição geográfica e prevalência global de brucelose

A brucelose ocorre em todos os Continentes, contudo está controlada na maioria dos países desenvolvidos. A doença clínica ainda é comum no Médio Oriente, Ásia, África, América Central e do Sul, na bacia mediterrânica e nas Caraíbas (Anexo I – Figura 18). Até 2016, apenas 18 países foram declarados oficialmente livres de brucelose em bovinos, ovinos e caprinos (Castaño, Navarro, & Solera, 2016).

B. melitensis é o principal agente causador de doença em países em desenvolvimento e encontra-se quase sempre associado a doença clinicamente aparente em humanos (Castaño et al., 2016). É particularmente comum na região mediterrânica, incluindo o sul da Europa e a sua distribuição é mais restrita do que a de *B. abortus* (Radostits et al., 2007). Nesta região ocorre de forma endémica, especialmente ao longo das suas costas norte e este, estendendo-se através da Ásia Central até ao sul da Península Arábica e a este até à Mongólia (European Commission, 2001). *B. melitensis* também ocorre com grande expressão em alguns países da América Latina, especialmente no México, Peru e no norte da Argentina (European Commission, 2001; Spickler, 2009a). Foi reportada em África e na Índia, mas não parece ser endémica no norte da Europa, América do Norte (exceto México), Sudeste Asiático, Austrália nem na Nova Zelândia (Spickler, 2009a) (Anexo I – Figura 18). Nos países mediterrânicos e no

Médio Oriente, o biovar 3 é o mais prevalente, enquanto que na América Latina o que predomina é o biovar 1 (Spickler, 2009b).

Na UE, os seguintes países e regiões foram reconhecidos como sendo livres de *B. melitensis*: Áustria, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Luxemburgo, Holanda, Suécia, Reino Unido, França, algumas províncias de Espanha e Itália e o arquipélago dos Açores (EFSA & ECDC, 2017) (Anexo I – Figura 18).

A prevalência da doença é influenciada por fatores tais como sistemas de produção associados a práticas agropecuárias, zonas agroecológicas, contacto com espécies silváticas e fatores de manejo (Godfroid et al., 2011).

O padrão epidemiológico da brucelose humana tem vindo a alterar-se, refletindo o sucesso dos planos de erradicação, as alterações em parâmetros socioeconómicos, melhorias nos sistemas de reconhecimento e notificação, e a evolução da “aldeia global”, através do turismo internacional (Pappas et al., 2006).

A incidência real de brucelose poderá ser mais elevada, devido à incapacidade de muitos países em reportar todos os casos humanos. Isto deve-se ao facto de que alguns casos são confundidos por outras doenças infecciosas e também porque o investimento atual no diagnóstico é inexistente ou incorreto, nesses países (Castaño et al., 2016).

2.5.2. Transmissão

A fonte de infeção é o animal infetado portador. A introdução da infeção num efetivo, não previamente exposto ao agente, ocorre com a introdução de animais infetados, ou pelo contacto com outros efetivos infetados (em pastos, por troca de animais, etc.). A persistência da infeção resulta da excreção do agente para o meio ambiente e a infeção de outros animais. A excreção ocorre principalmente a partir do trato reprodutivo e úbere (Radostits et al., 2007).

A transumância é um fator promotor da disseminação da brucelose em certas áreas, tal como o é o contacto entre animais em mercados ou feiras. A estabulação de animais em espaços reduzidos é comum em países de clima frio e é uma prática que facilita a transmissão de infeção entre indivíduos do mesmo rebanho (Corbel, 2006).

As principais espécies reservatório para a infeção em humanos são os ovinos, caprinos, bovinos, camelídeos, suínos, canídeos, bem como outros mamíferos. Em países industrializados, existe uma correlação clara entre a brucelose animal e o risco ocupacional a que se encontram expostos os profissionais de certas atividades, tais como: pastores, trabalhadores de matadouro, técnicos de laboratório de microbiologia, médicos, médicos veterinários e profissionais da indústria de laticínios. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, a doença em humanos afeta maioritariamente indivíduos que consomem

produtos de origem animal não pasteurizados ou não cozinhados (Castaño et al., 2016; Hugh-Jones, Hubbert, & Hagstad, 1995).

2.5.2.1. Vias de excreção e material contagioso

De forma geral, a transmissão de infecção ocorre da mesma forma entre ovinos, caprinos e bovinos. Os materiais infetados que são excretados a partir do trato genital feminino constituem a principal fonte de transmissão de *Brucella* para outros animais e humanos. Por esse motivo, na maioria dos casos, a via de disseminação primária do agente é a placenta, fluídos fetais e corrimentos vaginais expelidos por fêmeas infetadas, após aborto induzido por *Brucella* ou parto. Nessas situações, um grande número de organismos é excretado para o meio ambiente. Em cabras, a excreção vaginal do agente é prolongada (entre 2 a 3 meses, geralmente) e abundante. Em ovelhas, usualmente, a excreção é menos prolongada, cessando no espaço de 3 semanas após o aborto ou parto normal (European Commission, 2001). O organismo pode também estar presente no exsudado vaginal de fêmeas virgens não cobertas infetadas, contudo a transmissão entre animais é mais provável ocorrer como consequência da exposição massiva que apenas uma placenta infetada pode providenciar (Radostits et al., 2007). Tanto animais adultos como jovens se infetam pela ingestão de materiais infetados pelo agente, por infecção nasal ou conjuntival ou ainda por abrasões cutâneas (Radostits et al., 2007).

A excreção de bactérias do género *Brucella* também é usual a partir de secreções do úbere, sêmen e pode ser isolada a partir de vários tecidos, tais como linfonodos da cabeça, linfonodos associados ao aparelho reprodutor e por vezes a partir de lesões artríticas (European Commission, 2001). Na verdade, a excreção constante ou intermitente destes organismos no leite, nas lactações que sucedem a infecção, é consequência da infecção persistente das glândulas mamárias e linfonodos supramamários (European Commission, 2001).

A maior parte dos caprinos que se infetam durante a gestação, desenvolve infecção do úbere e excreta a bactéria no leite na lactação subsequente, contudo a excreção pode cessar durante a lactação. Desses indivíduos, muitos excretam também em todas as lactações seguintes. Em ovinos, o período de excreção do organismo no leite é geralmente mais reduzido do que nos caprinos, contudo este pode encontrar-se presente no leite ao longo de toda a lactação (European Commission, 2001; Radostits et al., 2007).

A ingestão de colostro e leite infetado também pode dar origem a infecções latentes. Esta é uma das principais vias de transmissão e de perpetuação da infecção numa manada ou rebanho e constitui uma importante fonte de infecção para humanos e animais jovens (European Commission, 2001; Radostits et al., 2007).

2.5.2.2. Modos de infecção

Os modos de infecção por *B. melitensis* podem ser diretos ou indiretos. Esta bactéria infeta animais diretamente através de aerossóis infetados ou assimilação de material infetado, através do trato gastrointestinal ou feridas na pele e mucosas (European Commission, 2001; Castaño et al., 2016).

As bactérias chegam aos linfonodos após a sua entrada no organismo do hospedeiro e sucede-se uma bacteriemia, geralmente conduzindo à infecção do útero, úbere e, por vezes, o baço. Os produtos de animais infetados e as condições ambientais constituem vias de transmissão secundárias, tão importantes quanto a via relacionada com o aborto (Castaño et al., 2016).

Outro modo de infecção é o pastoreio em pastagens simultaneamente partilhadas por animais livres de brucelose e infetados, ou quando os primeiros tomam contacto com excrementos ou outros materiais contaminados, também presentes em currais contaminados. Os organismos são, provavelmente, mais frequentemente adquiridos por ingestão; contudo, a inalação, inoculação conjuntival, contaminação cutânea e inoculação do úbere a partir de tetinas contaminadas constituem outras possibilidades (European Commission, 2001; Corbel, 2006).

Em machos, a infecção dos órgãos reprodutores geralmente resulta na excreção de *Brucella* no sémen. Todavia, quando usados em reprodução natural (monta), o risco de machos infetados transmitirem a doença a fêmeas suscetíveis parece reduzido. É também digno de nota que foi demonstrado que a transferência de embriões em bovinos, como técnica reprodutiva, é um método de transmissão pouco provável, contando que a técnica seja aplicada de forma correta (European Commission, 2001; Corbel, 2006).

Foi demonstrado que os cães representam vetores mecânicos e biológicos de brucelose. Estes podem adquirir a infecção por *B. abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis* a partir de ruminantes ou suínos que abortaram, normalmente pela ingestão de material placentário ou fetal infetado. Podem, posteriormente, excretar estas bactérias e por conseguinte constituir um risco de infecção para humanos e espécies pecuárias (European Commission, 2001; Corbel, 2006).

A disseminação por meio aquático é rara e é eficaz apenas em distâncias curtas (European Commission, 2001).

2.5.2.3. Vias de transmissão

Tanto em caprinos como em ovinos, podem ocorrer infecções latentes ou inaparentes como resultado da transmissão de *B. melitensis* das fêmeas às respetivas crias, durante a gestação ou no início do período pós-parto (European Commission, 2001; Corbel, 2006). Uma reduzida percentagem de borregos e cabritos é infetada *in utero*, não necessariamente resultando em aborto, pois podem sobreviver, mas apresentarem-se fracos ao nascimento ou podem mesmo

ser bastante viáveis (European Commission, 2001; Radostits et al., 2007). A maioria deste tipo de infeções é adquirida, presumivelmente, pelo consumo de colostro ou leite. Estes borregos ou cabritos podem apresentar infeções nos linfonodos que drenam o trato gastrointestinal e podem excretar as bactérias nas fezes (European Commission, 2001).

Os animais afetados por este tipo de infeções podem reter a mesma durante toda a sua vida e manter-se serologicamente negativos até depois do primeiro aborto ou parto (Corbel, 2006). Apesar da reduzida frequência de transmissão, a existência de infeções latentes dificulta grandemente a erradicação desta doença, uma vez que a presença de *B. melitensis* persiste, sem existir uma resposta imune detetável, devido à ocorrência de imunotolerância (European Commission, 2001).

Contudo, os indivíduos desmamados cedo e apartados das suas progenitoras e do ambiente contaminado podem conservar-se livres de infeção (Radostits et al., 2007).

B. melitensis é a principal espécie responsável pela ocorrência de brucelose em caprinos e ovinos, porém, em sistemas de produção extensivos, também afeta com frequência outras espécies de ruminantes (Blasco, 2010).

O contacto próximo entre diferentes espécies pecuárias, especialmente a criação de ovinos e/ou caprinos juntamente com bovinos, pode facilmente propiciar a exposição de animais não infetados à doença, a partir de múltiplas fontes, tendo sido reportado por muitos investigadores como um fator de risco para a transmissão de *Brucella* entre diferentes espécies animais. Todavia, esta transmissão não ocorre de forma indiferenciada em ambas as direções. Na verdade, enquanto que a infeção de ovinos e caprinos por *B. abortus* é raramente reportada, a infeção de bovinos por *B. melitensis* é reportada em casos em que estes animais contactavam com os ovinos e caprinos infetados (Godfroid et al., 2013). Apesar deste facto, não foram observados surtos de aborto em bovinos expostos pela primeira vez a este agente, o que acontece em casos de infeção por *B. abortus*. Na realidade, o conhecimento da patobiologia das infeções por *B. melitensis* em bovinos é surpreendentemente escasso. Não foi ainda possível estabelecer se *B. melitensis* se consegue manter indefinidamente numa população de bovinos na ausência de ovinos ou caprinos infetados (European Commission, 2001; Godfroid & Käsbohrer, 2002).

Em bovinos, a colonização do úbere por *B. melitensis* provoca a excreção do agente no leite que pode ser prolongada por meses ou anos, tendo levado com frequência a epidemias de brucelose em pessoas que trabalham com bovinos ou que bebem o seu leite. A resposta serológica é semelhante à que é observada em infeções por *B. abortus*. A erradicação é eficientemente alcançada por métodos convencionais de teste e abate de animais seropositivos (European Commission, 2001).

A infecção é usualmente transmitida a cães que co-habitam com rebanhos infetados, contudo sabe-se que estes eliminam a infecção com relativa rapidez. Não obstante, em certos países, é exigido que, quando se procede ao abate total de rebanhos de caprinos ou ovinos, se proceda também à eutanásia dos cães pastores que acompanham esses rebanhos ou, pelo menos, que estes sejam castrados e sujeitos a antibioterapia. Os cães, gatos e carnívoros silváticos, tais como raposas e lobos podem constituir vetores mecânicos de disseminação da infecção, ao deslocarem material infetado, tal como fetos ou membranas fetais (European Commission, 2001).

Os suínos são suscetíveis à infecção por *B. melitensis* e a transmissão a partir de pequenos ruminantes pode ocorrer em áreas onde os suínos são criados em explorações ao ar-livre (European Commission, 2001).

Algumas espécies de ruminantes silváticos que entrem em contato com ovinos ou caprinos infetados podem ser suscetíveis à infecção por *B. melitensis* e ter a capacidade de manter a infecção no ambiente natural (European Commission, 2001).

2.5.2.4. Sobrevivência de *B. melitensis* no ambiente

Em condições naturais, as espécies de *Brucella* spp. comportam-se como parasitas obrigatórios, incapazes de se multiplicar fora de hospedeiros mamíferos. Contudo, a capacidade destas espécies em persistir fora do seu hospedeiro é relativamente alta, quando comparada com a maioria das outras espécies de bactérias patogénicas não formadoras de esporos, em condições favoráveis, especialmente em água e meios aquosos (Crespo León, 1994b; European Commission, 2001).

São vários os estudos que avaliaram a persistência das espécies de *Brucella* spp. sob diferentes condições ambientais. Sabe-se que quando o pH, temperatura e condições luminosas são favoráveis, isto é, quando o pH é superior a 4, a humidade elevada, a temperatura baixa e há ausência de luz solar direta, *Brucella* spp. tem a capacidade de reter infecciosidade durante vários meses em água, fetos abortados e membranas fetais, fezes e chorume, lã, feno, em edifícios, equipamentos e roupas (European Commission, 2001). *B. melitensis* mantém-se viável em poeira e no solo durante 3 a 44 dias, 20 dias em estrume; em paredes e chão de curral, a baixas temperaturas, pode manter-se viável até 4 meses. Este organismo sobrevive na vegetação por períodos variáveis, dependendo das condições ambientais. Em pastos expostos à luz solar, pode sobreviver durante 15 dias e quando à sombra, durante 35 dias. Em climas temperados, a infecciosidade pode persistir por 100 dias no inverno e 30 dias no verão (Crespo León, 1994b; Radostits et al., 2007).

2.6. Controlo e erradicação da brucelose

2.6.1. Evolução histórica do controlo da BPR em Portugal

Em Portugal, as primeiras medidas tomadas para combater a brucelose dos pequenos ruminantes foram implementadas em 1953, através de campanhas de controlo em caprinos e em ovinos seus coabitantes. Desde essa data, a BPR é uma doença de declaração obrigatória (Decreto-Lei nº 39209, de 14 de maio de 1953).

Em 1991, após a adesão de Portugal à Comunidade Económica Europeia (CEE), foi aprovado para co-financiamento Comunitário o PEBPR (Decisão 91/217/EEC, 26 de março de 1991), que se encontra ainda em vigor tendo sido anualmente renovada a sua aprovação, com as adaptações necessárias. Este programa aplica-se à região continental de Portugal e pela primeira vez, em 2018, irá abranger a região autónoma da Madeira (RAM), prevendo-se nesta o estatuto de indemne em 2023. A região autónoma dos Açores está classificada como oficialmente livre de BPR e mantém um programa de vigilância (DGAV, 2018).

A estratégia adotada por Portugal foi a erradicação com base na classificação sanitária de efetivos e no aumento progressivo de áreas de classificação indemne de brucelose. Entre 1991 e 2001 as principais medidas sanitárias foram a identificação dos animais positivos através de serologia e o seu abate (Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional Norte [DSAVRN], 2012).

No início da aplicação do PEBPR, registou-se uma prevalência de 12% em explorações em Portugal continental. Com o passar do tempo e com o progressivo controlo da BPR, verificaram-se diferenças marcantes entre regiões com sistemas de produção distintos, taxas de contactos entre rebanhos e exposição ao meio ambiente contaminado. Na área de ação da Direção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes (DRATM), esta doença sempre teve níveis de incidência e prevalência, em explorações e animais, bastante superiores aos níveis nacionais. Nesta região, em 1991 registou-se uma prevalência de BPR a nível de rebanho de 26,7%, que em 2001 subiu para 43%. Os abates sanitários resultantes desta situação provocaram perdas avultadas para os proprietários dos efetivos e elevados custos para o governo (DGAV, 2018).

Em 2001, a situação sanitária justificou a introdução de um plano de vacinação massiva, através da aplicação da vacina Rev.1, via conjuntival, a jovens e adultos, cobrindo quase a totalidade das explorações da DRATM. A partir de 2004, terminou-se a vacinação de adultos e iniciou-se a fase de transição para o plano de erradicação, através do teste serológico e abate sanitário de animais positivos. Desde então, a vacina Rev.1 é aplicada apenas a animais jovens (entre 3 e 6 meses de idade). Contudo, nos últimos anos, mais concretamente em 2015, ocorreu um surto de brucelose numa área definida da Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo, tendo sido implementado um programa

especial de vacinação, incluindo a vacinação de animais adultos, para controlar o surto e que alcançou bons resultados (DGAV, 2018).

Como resultado das medidas atualmente implementadas, nos últimos anos observou-se uma diminuição do número de animais reagentes, do número de animais abatidos e, conseqüentemente, do valor total pago em indemnizações. De igual modo, o número de pessoas infetadas com brucelose na região de Trás-os-Montes diminuiu consideravelmente de 1998 a 2003, sendo essa diminuição evidente sobretudo a partir de 2001 (DGAV, 2018).

2.6.2. Organização, supervisão e implementação do PEBPR em Portugal

De acordo com o disposto no PEBPR (DGAV, 2018), a autoridade responsável pelo controlo e erradicação da BPR é a DGAV e a Direção de Serviços de Proteção Animal (DSPA) – seu serviço operativo central – é responsável pela coordenação e monitorização do programa. A supervisão e implementação das várias atividades do programa em cada região do país, a monitorização do cumprimento dos requisitos legais decorrentes dos acordos assinados com as OPP, a atribuição da marca oficial de exploração (ME) a cada rebanho cujo registo tenha sido autorizado, a atribuição do estatuto sanitário aos rebanhos e a implementação de restrições em rebanhos positivos são responsabilidades das 5 Direções de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais (DSAVR – Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve) – serviços descentralizados da DGAV.

A maioria das atividades de campo do PEBPR é implementada pelas OPP, que submetem anualmente um programa a aprovação pelos serviços oficiais. As OPP são responsáveis por: identificação de animais, vacinação, colheita de amostras de sangue e sua submissão ao laboratório, informatização de dados no programa informático para a saúde animal (PISA.net) e comunicação de todas as irregularidades às respetivas DSAVR.

O laboratório nacional de referência responsável pela coordenação e supervisão técnica dos laboratórios oficiais e privados é o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). As suas delegações executam o teste Rosa Bengala (RB) e o Teste de Fixação do Complemento (FC) e emitem os resultados no PISA.net. Por outro lado, o exame bacteriológico de *Brucella* e a sua tipagem são realizados no INIAV, a nível central e os resultados são comunicados eletronicamente à DGAV. A amostragem durante o abate de animais positivos é realizada pelo veterinário oficial dos serviços de vigilância sanitária das DSAVR.

Os proprietários dos rebanhos de pequenos ruminantes têm como responsabilidades fornecer acesso e meios para implementar as medidas do PEBPR nos seus animais, cumprir as regras de identificação e movimentação de animais, fazer a declaração anual de animais existentes no

efetivo, comunicar ao Sistema de Recolha de Cadáveres de Animais Mortos na Exploração (SIRCA) ou Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA) a morte de animais ocorrida na exploração, permitir o carregamento e transporte para o abate sanitário, cumprir as restrições de movimento e os períodos de despovoamento impostos após o abate total e notificar a ocorrência de abortos no seu efetivo, de acordo com o Decreto-Lei nº 244/2000, de 27 de setembro. Por outro lado, os proprietários têm direito a compensação financeira pelos animais sujeitos a abate sanitário, contando que tenham cumprido com as suas responsabilidades e preceitos legais relativos ao PEBPR e à movimentação animal.

2.6.3. Fundamentos dos programas de controlo e erradicação de BPR

Existem certas condições para que haja uma implementação de programas de controlo e de erradicação de brucelose bem-sucedidas. A disponibilidade de serviços de saúde animal competentes e a colaboração interdisciplinar destes com laboratórios e serviços de saúde pública, a aplicação de medidas de vigilância, o bom manejo dos efetivos, a produção intensiva e o controlo da movimentação e comércio (nacional e internacional) de animais promovem o sucesso destes programas. Por outro lado, a obrigatoriedade de pasteurização de produtos lácteos permite proteger o consumidor do contágio por *Brucella* (Solera & Castaño, 2008; Godfroid et al., 2011).

Considerando que a transmissão de brucelose de pessoa para pessoa (através da amamentação ou contacto sexual) não tem importância epidemiológica, praticamente todos os casos em humanos têm origem no animal reservatório. Assim sendo, é de fundamental importância o controlo e erradicação da doença nestes animais (FAO et al., 2006; Godfroid et al., 2013).

De uma forma geral, inicialmente a infeção é controlada pela obrigatoriedade de vacinação dos efetivos, sendo gradualmente restringida e eventualmente proibida, passando a ser implementada a política de “teste e abate”, por forma a erradicar a infeção. A atribuição de compensação financeira aos proprietários dos animais abatidos é fundamental para o sucesso destes programas, que são cofinanciados, na UE, pelos Estados-Membro (Godfroid et al., 2013).

É fundamental, em todos os casos, identificar a espécie do hospedeiro reservatório (especialmente perante sistemas de produção com múltiplas espécies) e a espécie de *Brucella* causadora de infeção em animais, por forma a promover medidas de controlo eficazes (Godfroid et al., 2013).

2.6.4. Medidas aplicadas no controlo e erradicação da BPR em Portugal

Para uma identificação definitiva do agente é necessária uma combinação de características de crescimento, métodos serológicos, bacteriológicos ou moleculares (World Organisation for Animal Health [OIE], 2016). As medidas a serem aplicadas, segundo o previsto no PEBPR, baseiam-se na política de pesquisa serológica e bacteriológica, com abate de animais positivos – com vista à erradicação – e na vacinação de animais jovens com a vacina Rev.1, apoiadas na identificação animal. Outras medidas de controlo são igualmente importantes, nomeadamente a regulamentação da movimentação de animais e a investigação epidemiológica de surtos de BPR. O tratamento da BPR em pequenos ruminantes é expressamente proibido (DGAV, 2018).

2.6.4.1 Profilaxia contra a BPR – Vacina Rev.1

A vacinação é o método mais eficaz para reduzir a incidência de brucelose nos animais (Nicoletti, 2010). A vacina viva atenuada da estirpe *B. melitensis* Rev.1 é a vacina mais amplamente utilizada e bem-sucedida na prevenção de brucelose em pequenos ruminantes, protegendo-os contra *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* e, apesar de suas desvantagens, continua a ser a vacina de referência para a profilaxia de BPR, sendo altamente imunogénica e de custo reduzido. Os programas de vacinação total do rebanho repetidos no tempo são a medida mais indicada para o controlo da infeção perante prevalências elevadas, más condições socioeconómicas e sistemas de produção em regime extensivo; quando a vacinação é corretamente aplicada nestes programas, geralmente é obtida uma grande diminuição na prevalência de brucelose (Solera & Castaño, 2008; Blasco, 2010; Nicoletti, 2010; OIE, 2016).

A dose administrada deverá ter entre $0,5$ e 2×10^9 organismos viáveis, em 30 a 50 μ l, sendo que doses inferiores conferem uma proteção significativamente inferior, pelo que não são recomendadas (OIE, 2016). A sua aplicação deverá ser feita, por via conjuntival, até aos 6 meses de idade, que representa o limite superior de idade para minimizar a resposta de anticorpos e tornar esta vacinação compatível com os testes de diagnóstico serológicos, uma vez que os anticorpos produzidos em resposta à vacina são detetados nestes testes, dificultando a sua interpretação. Por este motivo, é proibida a aplicação desta vacina em países onde a erradicação de *B. melitensis* tenha sido alcançada (Solera & Castaño, 2008). A administração subcutânea induz respostas serológicas de longa duração, pelo que interfere com estes testes, não sendo recomendada em programas de erradicação combinados (vacinação, teste e abate). A administração por via conjuntival, na dose padrão, confere o mesmo grau de proteção, não induzindo resposta humoral persistente. É de notar que a

imunidade conferida pela vacina vai diminuindo com o tempo (Solera & Castaño, 2008; Blasco, 2010; Godfroid et al., 2013; OIE, 2016).

A virulência da vacina Rev.1 é reduzida, mas deve manter uma virulência mínima para ser eficiente. A manipulação desta vacina deverá ser cuidadosa, por forma a evitar contaminações ambientais ou infeção em humanos. Esta estirpe vacinal é resistente a estreptomicina. Pelos motivos expostos, devem ser praticadas campanhas de sensibilização dirigidas às pessoas que manipulem esta vacina e implementadas medidas de biossegurança individuais, por forma a reduzir o risco de infeção por Rev.1 em humanos (Blasco, 2010; OIE, 2016).

A vacina Rev.1 causa frequentemente aborto e excreção do agente no leite quando os animais são vacinados durante a gestação. Estes efeitos secundários podem ser consideravelmente reduzidos quando os adultos são vacinados com a dose padrão, por via conjuntival, durante o final da época de partos, lactação e antes da época reprodutiva, apesar destas condições não serem inteiramente seguras (Blasco, 2010; OIE, 2016).

Segundo o disposto no PEBPR (DGAV, 2018), a vacina Rev.1 é aplicada em determinadas áreas do continente com maior prevalência, nomeadamente em Trás-os-Montes (DSAVR Norte), em toda a Região do Algarve e em alguns efetivos da Região Centro e Lisboa e Vale do Tejo. Os animais jovens (entre 3 e 6 meses de idade) serão vacinados (uma única vez), com dose completa, via conjuntival, em rebanhos indemnes e não indemnes (excetuam-se os rebanhos B4 em regime especial, sem vacinação), sendo feita a sua identificação por marca auricular de cor verde. Estes animais deverão apresentar bom desenvolvimento, ausência de sinais de condições debilitantes ou atividade sexual e de serologia positiva a BPR – é feita a colheita de amostras de sangue para serologia aquando da vacinação e 18 meses após a mesma. A vacinação de animais adultos é permitida em casos particulares, sob autorização da DGAV, sendo estes animais testados serologicamente para a BPR 24-36 meses após a vacinação.

A importância da imunização com a vacina Rev.1 como estratégia de controlo da BPR deve-se ao facto de esta permitir a proteção dos animais contra a infeção, reduzir a excreção de *Brucella* no ambiente e no leite – interrompendo assim a transmissão do agente – e simultaneamente reduzir o número de abortos e de animais abatidos por questões sanitárias (Solera & Castaño, 2008; DGAV, 2018).

2.6.4.2. Testes de diagnóstico serológicos

Nenhum teste serológico é apropriado em todas as situações epidemiológicas e em todas as espécies animais; todos os testes têm limitações, especialmente ao rastrear animais

individualmente, pelo que o controlo e diagnóstico devem ser aplicados a nível do rebanho (Corbel, 2006; OIE, 2016). Deve-se considerar todos os fatores que afetam a relevância do método de teste e os resultados do teste para uma interpretação ou diagnóstico específicos (OIE, 2016). A metodologia mais eficiente e económica é o rastreio de todas as amostras, usando um teste rápido, barato e sensível o suficiente para detetar uma elevada proporção de animais infetados. As amostras positivas ao rastreio são depois testadas, utilizando testes confirmatórios específicos mais sofisticados para a produção do diagnóstico final (Corbel, 2006).

Em Portugal, as OPP recolhem sangue para uma pesquisa serológica anual de todos os rebanhos de reprodução com os testes RB e FC, usado como teste confirmatório. Perante resultados positivos o rebanho é sujeito a posterior reinspeção. As amostras de sangue colhidas são encaminhadas pelas OPP para análise em laboratórios aprovados, sendo os resultados comunicados no PISA.net e as classificações sanitárias atribuídas aos rebanhos pelas DSAVR, de acordo com os resultados aos testes RB e FC. Algumas regiões já alcançaram uma situação epidemiológica favorável, permitindo a seleção de uma amostra de rebanhos, em conformidade com a Diretiva 91/68/CEE de 28 de janeiro de 1991.

É importante referir que os métodos serológicos utilizados não possibilitam diferenciar qual *Brucella* spp. induziu a produção de anticorpos no hospedeiro ou se a resposta serológica positiva resulta da presença de anticorpos vacinais. Adicionalmente, certas bactérias, como *Yersinia enterocolitica* 0:9, podem provocar produção de anticorpos que causam reações serológicas falso-positivas (FPSR) nos testes utilizados para pesquisa de brucelose. A junção destes fatores dificulta a produção de inferências epidemiológicas e diagnósticos serológicos precisos na presença de seropositividade (Godfroid et al., 2013; OIE, 2016).

2.6.4.2.1. Teste de Rosa de Bengala (RB)

O teste RB é geralmente utilizado como teste de deteção e caso uma amostra serológica seja classificada como RB positiva, o resultado é normalmente confirmado pela realização do teste FC. O teste RB é o método serológico de eleição para deteção precoce em situações enzoóticas (Godfroid et al., 2013; OIE, 2016).

O RB é baseado na reação positiva perante a aglutinação de anticorpos IgM séricos com uma preparação de *Brucella*, célula inteira corada. Este teste é realizado misturando numa placa de vidro uma gota de reagente com um volume igual de soro e a aglutinação é lida após 2 a 4 minutos. A sensibilidade do teste RB é muito alta (> 99%), porém a sua especificidade pode ser baixa, pelo que requiere confirmação através de um teste mais específico. Contudo, um

resultado negativo ao teste RB exclui a ocorrência de brucelose ativa no rebanho com um elevado grau de certeza (Corbel, 2006; Solera & Castaño, 2008).

2.6.4.2.2. Teste de Fixação do Complemento (FC)

O teste FC é amplamente utilizado, por ter boa sensibilidade e especificidade, mas é de complexa execução e requer boas instalações laboratoriais e pessoal adequadamente treinado para titular e manter com precisão os reagentes. Caso se reúnam as condições necessárias para a sua correta execução, os seus resultados são bastante satisfatórios (Corbel, 2006; Godfroid et al., 2013; OIE, 2016).

O teste FC é utilizado para testar a presença de anticorpos específicos numa amostra serológica. A sua presença é confirmada pela precipitação dos eritrócitos de ovelha (EO) e ausência de alteração de cor da amostra. Tal deve-se ao facto de não ocorrer indução de hemólise dos EO, pois o complemento adicionado, numa amostra positiva a brucelose, encontra-se ligado aos complexos antígeno-anticorpo específicos, não interagindo assim com os anticorpos anti-EO. Os resultados serão considerados positivos caso os títulos no soro sejam superiores ou iguais a 20 UI/ml (Diretiva 91/68/CEE de 28 de janeiro de 1991).

No teste FC, em soros a baixas diluições, pode ocorrer o fenómeno prozona, que resulta da não fixação do complemento, devido à presença de níveis elevados de isotipos de anticorpos fixadores não complementares que competem pela ligação ao antígeno. Podem também ocorrer reações “anticomplementares”, quando bactérias contaminantes ou outros fatores na amostra serológica fixam ou destroem o complemento, causando reações positivas no teste, mesmo na ausência do antígeno (Corbel, 2006).

2.6.4.3. Abate sanitário de animais serologicamente positivos

O PEBPR prevê que em efetivos B3, sejam abatidos os animais positivos ao teste RB e ao teste FC (títulos ≥ 20 UI/ml) e seja suspensa a classificação sanitária da exploração, sendo efetuada colheita de material para exame bacteriológico e identificação do agente. Em efetivos B3.S, os animais positivos ou negativos ao teste RB e positivos ao teste FC (títulos ≥ 20 UI/ml) serão abatidos, sendo efetuada colheita de material para exame bacteriológico e identificação do agente. Em efetivos B3 e B3.S, os animais positivos ao teste RB e que apresentem títulos ≤ 20 UI/ml ao teste FC não serão considerados positivos (Anexo II).

Em efetivos B2 e B2.1 serão abatidos os animais não vacinados ou vacinados em adultos que sejam positivos ao teste RB ou positivos ao teste FC (títulos ≥ 20 UI/ml) – aplicação dos testes

em série. Os animais vacinados em jovens serão abatidos caso sejam positivos ou negativos ao teste RB e positivos ao teste FC (títulos ≥ 20 UI/ml). Caso estes animais sejam positivos ao teste RB e apresentem títulos ≤ 20 UI/ml ao teste FC, serão novamente testados e caso mantenham reação positiva serão abatidos. Em efetivos B2 será feita colheita de material para exame bacteriológico e identificação do agente (Anexo II).

2.6.4.4. Testes de diagnóstico bacteriológicos – confirmação da infecção

O exame bacteriológico, aplicado a animais sujeitos a abate sanitário, é um método importante na definição do estatuto sanitário de explorações sem anterior confirmação de infecção, na avaliação epidemiológica de BPR e monitorização do progresso do programa de vacinação. O isolamento e identificação de *Brucella*, apesar de ser lento, caro e complexo, é o único método que oferece um diagnóstico definitivo e seguro de brucelose, pelo que deve ser realizado sempre que possível para confirmar a doença e determinar as espécies e biovars de *Brucella* envolvidos (Corbel, 2006; Godfroid et al., 2013; OIE, 2016).

Na sua execução, são recolhidas amostras de linfonodos e outros órgãos de 10% dos animais serologicamente positivos de cada rebanho – exceto dos provenientes de explorações B2.1.

Um animal será considerado infetado caso se verifique isolamento bacteriológico de *Brucella* e à exploração a que este pertença será atribuída classificação sanitária B2.1 (Anexo II) (DGAV, 2018).

O isolamento de *Brucella* pode ser realizado *post-mortem* ou após um aborto ou parto de animal infetado. De facto, os organismos do género *Brucella* são excretados em grande número durante o parto, sendo possível realizar culturas, utilizando meios de cultura seletivos, a partir de muco vaginal, placenta, conteúdo estomacal fetal, mas também a partir de leite, sêmen e lesões artríticas. Para isolamento *post-mortem* de *Brucella*, os tecidos indicados são os linfonodos supramamários, ilíaco-interno e retro-faríngeos, glândulas mamárias, baço, testículos e útero gravídico (Corbel, 2006; OIE, 2016).

As colónias bacterianas podem ser provisoriamente identificadas como *Brucella* com base nas suas propriedades culturais e aparência, coloração Gram e aglutinação com anti-soro positivo. Se disponível, pode ser utilizado um método de identificação molecular baseado em PCR. A identificação definitiva de colónias suspeitas só pode ser feita usando técnicas disponíveis nos Centros de Referência para *Brucella* (Corbel, 2006).

Os esfregaços de cotilédones placentários, conteúdo estomacal fetal ou corrimento vaginal podem ser corados usando os métodos Ziehl-Neelsen modificado ou Kisters. A observação de

grandes agregados de organismos intracelulares, corados a vermelho sobre fundo azul (pela resistência à descoloração por ácidos fracos), com morfologia similar a *Brucella* ou de organismos imuno-especificamente corados, indica a probabilidade da presença de brucelose. Contudo, é necessário considerar que outros agentes infecciosos, como *Coxiella burnetii* ou *Chlamydia*, se podem assemelhar a *Brucella*. Os resultados obtidos, quer sejam positivos ou negativos, deverão ser confirmados por cultura bacteriológica (Corbel, 2006; OIE, 2016).

2.6.4.5. Identificação animal

A rastreabilidade individual é fundamental para a correta execução das medidas do PEBPR e é conseguida através da identificação de ovinos e caprinos, segundo o Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de julho de 2006. Esta inclui os seguintes elementos: identificadores duplos (1 identificador eletrónico – bolo ruminal ou brinco eletrónico – e 1 identificador visível – marca auricular convencional) para cada animal nascido após 31 de dezembro de 2009; manutenção de registos em cada exploração; 1 documento de movimentação para cada movimento de grupos de animais; um registo central ou base de dados informatizada de todas as explorações e movimentos de animais nacionais. Os ovinos e caprinos deverão ser identificados antes dos 6 meses de idade e antes de deixarem a exploração onde nasceram. Porém, para animais criados em explorações em regime extensivo ou ao ar livre, o prazo é de 9 meses. Desta forma, é possível identificar quais os animais com serologias ou bacteriologias positivas, bem como o seu efetivo e estatuto vacinal e aplicar as medidas previstas no PEBPR, conforme cada situação.

2.6.4.6. Controlo da movimentação de animais

De acordo com o Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de julho de 2006, qualquer movimentação de animais deverá ser acompanhada de uma autorização de circulação emitida pelo SNIRA, a pedido do produtor de origem, de acordo com a classificação sanitária das explorações em causa, cabendo ao destinatário confirmar a chegada dos animais dentro de 7 dias. Não é permitida a movimentação de animais a partir de explorações não indemnes (B2), nem aqueles que tenham como origem ou destino explorações B2.1, B3.S ou B4.S, exceto para abate sanitário.

Contudo, a movimentação de animais da exploração de origem para a pastagem ou a prática de transumância é permitida, caso os animais pertençam a explorações B3 ou B4, uma vez que nestas explorações não há restrição à movimentação. Neste caso, os testes serológicos de pré-

movimentação (30 dias antes da movimentação dos animais) são obrigatórios, bem como no caso de repovoamento de explorações após o abate total (despovoamento).

No que respeita ao movimento animal de efetivos sob vigilância, este é permitido apenas para abate. Sempre que os contactos entre rebanhos sejam regulares, estes são considerados como a mesma unidade epidemiológica e todas as explorações relacionadas ficam sujeitas a restrições.

O controlo das movimentações de animais é realizado pelas DSAVR e OPP, nas visitas às explorações. Adicionalmente, é feito o seu controlo em trânsito pela Guarda Nacional Republicana.

2.6.4.7. Investigação epidemiológica de surtos de BPR

A investigação epidemiológica dos efetivos em relação à BPR é um método de fundamental importância na erradicação da mesma e é realizada pelas DSAVR e OPP. Desta forma, é possível confirmar ou invalidar uma suspeita de BPR, determinar a origem da infeção, identificar rebanhos que poderão ter estado em contacto com um rebanho infetado, avaliar a presença de fatores de risco e determinar medidas específicas de combate à doença.

Todos os rebanhos infetados são sujeitos a investigação epidemiológica e, em 2017, foram adotados procedimentos adicionais para a gestão de FPSR (DGAV, 2018).

2.7. Situação sanitária da BPR em Portugal

2.7.1. Fatores de risco e dificuldades técnicas identificados na aplicação do PEBPR

O PEBPR (DGAV, 2018) prevê a investigação epidemiológica dos rebanhos positivos para avaliar a origem da infeção. Os principais motivos identificados foram, em ordem de importância: a introdução de animais, os contactos em pastagens e outros e também a reincidência.

Por outro lado, as dificuldades técnicas identificadas na implementação do PEBPR estão relacionadas com uma série de situações de difícil gestão:

- A ocorrência de resultados positivos ao teste RB, com baixos títulos no teste FC, em animais vacinados – ou mesmo em animais não vacinados – num mesmo rebanho, na ausência de qualquer sinal clínico de doença constitui uma grande adversidade para o sucesso do programa, considerando a dificuldade dos proprietários em compreender essas situações;
- A dificuldade na execução de IE em rebanhos pequenos localizados em áreas marginais, onde a acessibilidade é difícil, também constitui um problema;

- O controlo de contactos entre rebanhos.

Apesar das dificuldades enfrentadas, os indicadores atingidos até à data revelam um bom progresso do programa, ainda que a fase imediatamente anterior à erradicação seja mais difícil de gerir e alcançar. Os objetivos intermédios representam um decréscimo em 2 anos, que será difícil de atingir dada a taxa atual de progresso. Em 2018, prevê-se atingir valores de 0,58% e 0,43% para a prevalência e incidência de BPR em rebanhos, respetivamente e em 2019, de 0,40% e 0,20%, na mesma ordem.

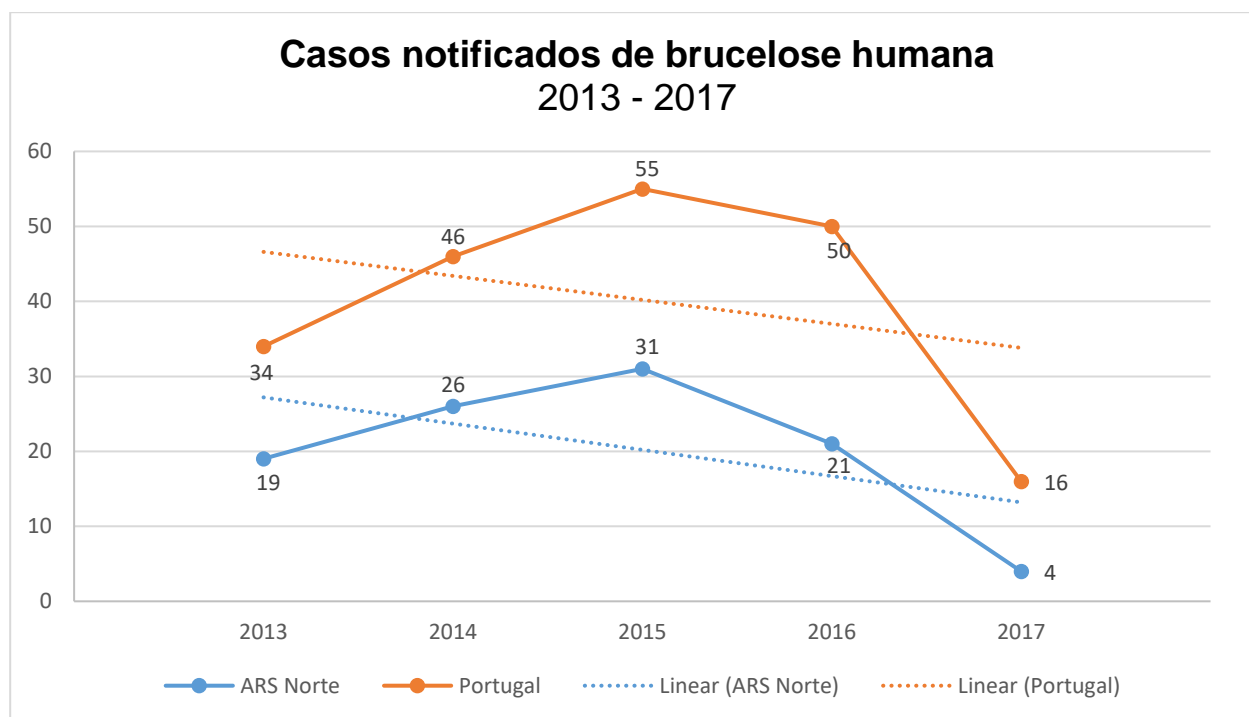
2.7.2. Brucelose humana em Portugal

Entre 1950 e 1954, o número de casos notificados de brucelose humana foi de várias centenas, verificando-se um decréscimo a partir desse ano, possivelmente como resultado da implementação das medidas de controlo da doença em populações animais em 1953. A partir dessa data, verificaram-se picos esporádicos, tendo atingido um número máximo histórico em 1989. O número de casos de brucelose humana voltou a decrescer a um ritmo satisfatório a partir de 1994, o que coincide com o alcançar de uma boa cobertura do PEBPR, após o início da sua implementação (Anexo III – Figura 20).

A expressão da doença na população humana também assume grande importância em Trás-os-Montes, onde foram reportados 32,1% dos casos notificados em Portugal, em 1999 (European Commission, 2012). Em 2016, na mesma região, este valor foi significativamente inferior, registando-se 10% dos casos notificados em Portugal (Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância, 2017b), o que denota uma evolução desejável (Figura 1).

Nos últimos anos, entre 2013 e 2015, verificou-se um aumento do número de casos a nível nacional, sendo que a maioria destes foi notificada na Administração Regional de Saúde (ARS) Norte (Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância, 2017b). Os últimos dados existentes, revelam uma ligeira, mas não significativa, diminuição do número de casos notificados entre 2015 e 2016, seguida de uma notável diminuição do número de casos entre 2016 e 2017 (Figura 1).

Figura 1. Casos notificados de brucelose humana em Portugal e na ARS Norte entre 2013 e 2017 (Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância, 2017b).



2.7.3. Evolução da prevalência e incidência da BPR em Portugal

Entre 2011 e 2017, verificou-se uma tendência decrescente na prevalência de BPR em rebanhos (percentagem de rebanhos com pelo menos um animal serologicamente positivo), tanto em Portugal continental como na DSAVR Norte, revelando uma evolução favorável deste indicador epidemiológico. Entre 2015 e 2016, em Portugal continental, registou-se uma redução de 31% na prevalência de BPR em rebanhos e de 39% na percentagem de animais positivos. Em 2017 ocorreu um ligeiro aumento destes valores. Todas as regiões com exceção da DSAVR Norte apresentam, atualmente, prevalências em rebanho inferiores a 1%. Nesta região, entre 2015 e 2016, verificou-se uma redução de 31% na prevalência de BPR em rebanhos, seguida de um aumento deste indicador em 57%, entre 2016 e 2017. Através das medidas preconizadas no PEBPR conseguiu-se alcançar uma redução da prevalência de BPR em rebanhos de 12% em 1993 para 0,73% em 2017 (Figura 2 e Figura 3) (DGAV, 2018).

Figura 2. Prevalências de BPR em explorações e animais em Portugal continental entre 2008 e 2017 (DGAV, 2018).

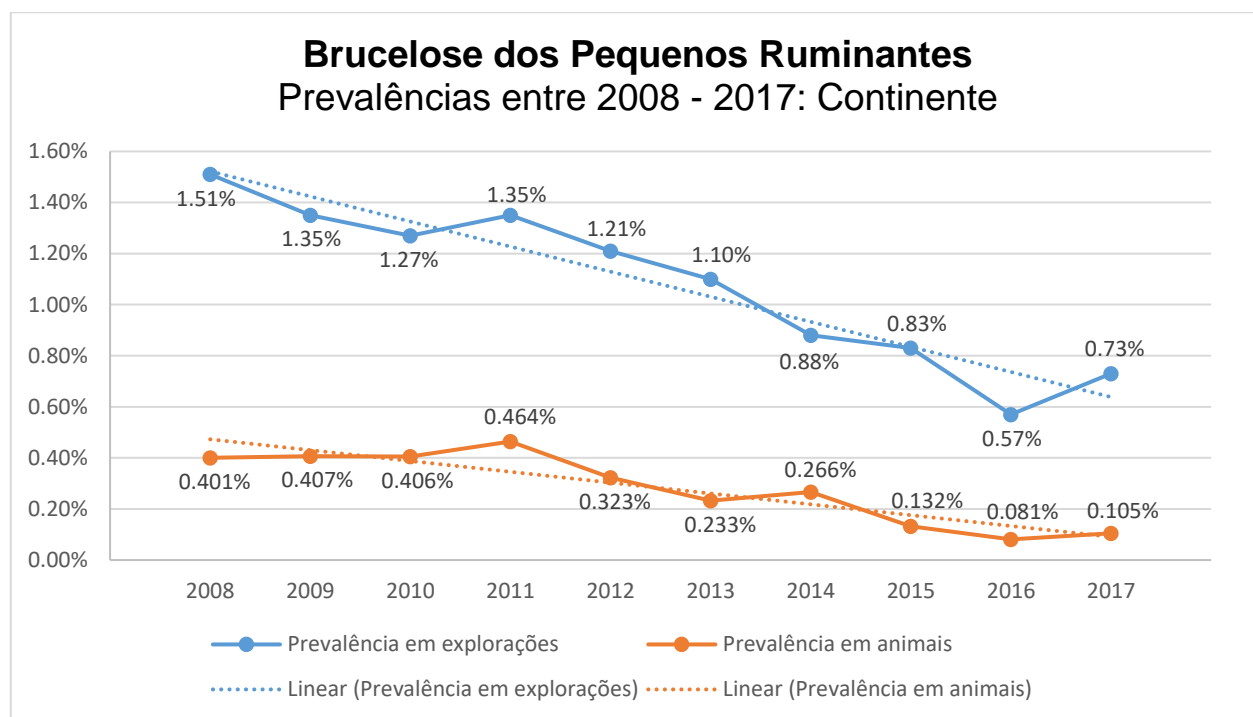
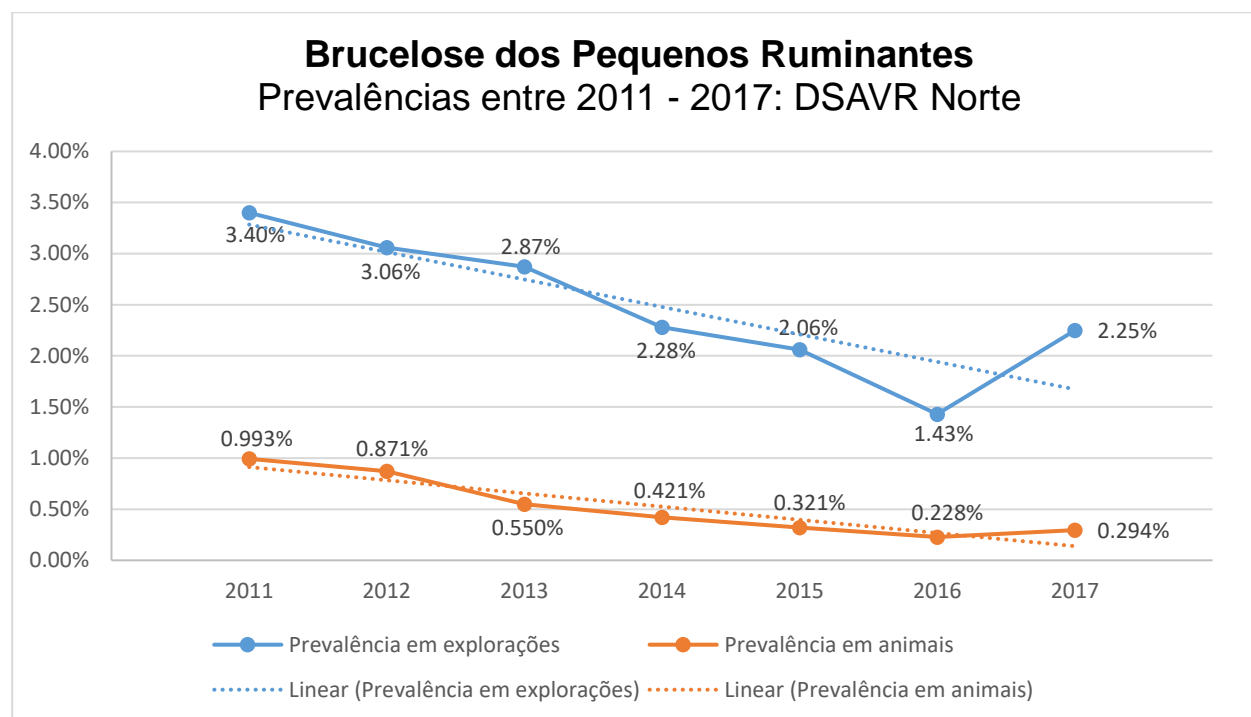


Figura 3. Prevalências de BPR em explorações e animais na região da DSAVR Norte entre 2011 e 2017 (DGAV, 2018).



Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve como objetivos contribuir para a avaliação da aplicação do PEBPR em Trás-os-Montes, acompanhando as atividades da OPP e DSAVR Norte e estudar os fatores de risco ao nível da exploração.

Assim, foram acompanhadas as brigadas de uma OPP e brigadas da DAV de Vila Real, DSAVR Norte, na execução das atividades de campo do PEBPR e, por forma a identificar os fatores de risco associados à ocorrência de BPR nos rebanhos da amostra, foi realizado um estudo observacional transversal analítico, através de IE aos produtores. Os dados colhidos foram sujeitos a uma análise univariada comparando explorações infetadas e não infetadas, recorrendo ao teste de Fisher. As variáveis significativas a esta análise foram incluídas num modelo de regressão logística múltipla, com o intuito de determinar os principais fatores associados à ocorrência de infeção.

3.1. Execução das atividades de campo do PEBPR

As explorações foram visitadas no decorrer de intervenções sanitárias agendadas pela OPP ou aquando da recolha, por parte da DAV, de animais reagentes ou positivos à brucelose, destinados a abate sanitário.

As explorações em que se trabalhou nas intervenções sanitárias encontravam-se distribuídas por três concelhos do distrito de Vila Real.

As intervenções sanitárias a cargo da OPP, aplicadas aos rebanhos de pequenos ruminantes, consistiam na colheita de sangue para realização dos testes RB e FC e eventual reinspecção, vacinação com a vacina Rev.1, identificação animal e desparasitação do efetivo.

Da mesma forma, aquando da visita, era também realizada a observação sobre o cumprimento de requisitos sanitários na exploração. A falta de cumprimento de todos os requisitos foi agrupada numa variável de análise, não particularizando cada tipo de irregularidade.

Os técnicos ao serviço da DSAVR Norte efetuavam a marcação a fogo dos animais destinados a abate sanitário e realizavam o seu carregamento imediato para o matadouro onde se realizava o abate sanitário.

3.2. Identificação de fatores de risco através de Inquérito epidemiológico (IE)

3.2.1. Preparação e implementação do IE

A estrutura do IE utilizado foi desenhada no âmbito deste trabalho, tendo por modelo os IE utilizados pela DGAV, mas adaptado por forma a incluir apenas questões pertinentes para a análise dos fatores de risco de transmissão da brucelose entre rebanhos e melhor caracterizar o tipo de manejo praticado na região. Entre as 74 questões do IE, existiam questões de caracterização da exploração, do efetivo animal, do manejo da exploração e questões cujo intuito era a caracterização do proprietário da exploração visitada (Anexo IV).

Os IE foram realizados, pessoalmente, a um total de 88 proprietários de explorações de pequenos ruminantes, entre novembro de 2014 e fevereiro de 2015. Cada IE demorou de 15 a 30 minutos a realizar, sendo que eram aplicados através de conversa, onde se recolhiam todos os aspetos a investigar.

Após a realização dos IE aos proprietários dos rebanhos de cada exploração, eram descritas, em relatório, as características particulares da exploração: caracterização das instalações, o seu propósito e a área em redor da exploração; localização da exploração, proximidade de outros rebanhos, identificação das pastagens e caminhos utilizados, condicionalismos ao contacto com outras espécies suscetíveis; práticas de manejo; atividades desenvolvidas na intervenção sanitária ou recolha de animais; observação de práticas que representassem risco para a transmissão de brucelose a humanos ou outros animais.

O registo das coordenadas geográficas de cada exploração e mercado de gado de Chaves foi realizado no momento da visita aos mesmos, com recurso à tecnologia GPS. Para cada exploração, foi registado o concelho e freguesia a que pertenciam, bem como as coordenadas da latitude e longitude, no sistema de coordenadas geográficas. A georreferenciação destes locais foi posteriormente confirmada por consulta de imagens de satélite (dados do mapa ©2015 Google). Para construção de mapas foi recolhida a carta administrativa oficial de Portugal (CAOP), junto da Direção-Geral do Território.

3.2.2. Representatividade da amostra

A amostra resultou das explorações visitadas pela OPP e DSAVR Norte no decorrer do estágio, tratando-se assim de uma amostra de conveniência, não representativa. No entanto, esta amostra destina-se a um estudo analítico, onde se pretende identificar um grupo de explorações com BPR e um grupo de explorações sem BPR. Foram visitadas 80 explorações localizadas no concelho de Chaves, 6 no concelho de Valpaços e 2 no concelho de Boticas. No concelho de Chaves existia uma população de 375 explorações de pequenos ruminantes.

Por forma avaliar a representatividade da amostra, foi calculado o erro de amostragem, considerando um valor de prevalência de 50%, de maneira a obter o valor máximo para este erro, com um intervalo de confiança de 95%. Para tal foram utilizadas as seguintes fórmulas (Thrusfield, 2007):

$$n = \frac{Z^2 \times P \times (1-P)}{d^2} \quad ; \quad n' = \frac{N \times n}{N+n}$$

Onde: n = dimensão necessária da amostra;

Z = coeficiente z (1,96 de acordo com o intervalo de confiança considerado);

P = prevalência (0,5);

d = erro de amostragem;

N = dimensão da população estudada (375);

n' = dimensão da amostra estudada (80).

Assim sendo, pode afirmar-se que, considerando um intervalo de confiança de 95%, a amostra estudada apresenta um erro de 9,1%.

3.2.3. Dados demográficos, sanitários e laboratoriais

Paralelamente, foram também recolhidos e analisados dados demográficos e sanitários (vacinação, resultados laboratoriais, etc.) referentes aos animais da amostra de explorações estudadas, constantes nas bases de dados das plataformas da DGAV de gestão de efetivos e saúde animal, SNIRA e PISA.net. Da população de explorações de pequenos ruminantes do concelho de Chaves, foi recolhido o número de animais de cada rebanho, nas mesmas plataformas.

As características demográficas do efetivo animal foram recolhidas após a sua atualização no SNIRA e PISA.net, posteriormente à visita da exploração. Estas características compreendiam a espécie (ovina ou caprina), aptidão produtiva (produção de carne ou de leite), sexo, data de nascimento e exploração de nascimento de cada animal, sendo que tanto a cada animal, como a cada exploração era atribuído um código de identificação individual. A identificação dos animais era feita não só pela marca auricular, mas também por meio de identificação eletrónica, sob a forma de um bolo reticular ou brinco eletrónico.

Os dados sanitários analisados incluem a situação vacinal de cada animal, ou seja, se estes foram sujeitos a imunização com a vacina conjuntival Rev.1. Os dados provenientes do PISA.net indicavam a data de vacinação do animal, sendo que a ausência deste registo significa que ao animal nunca tinha sido administrada esta vacina. Aos animais com o registo

temporal da vacinação foi atribuído o estatuto de vacinado com a vacina Rev.1 e aos animais sem esse registo foi atribuído o estatuto de não vacinado.

Os dados laboratoriais, para cada rebanho, abrangem todos os resultados obtidos, retrospectivamente, desde os correspondentes à colheita feita no dia da visita ao efetivo até um ano e dois meses antes do início do período de estágio (setembro de 2013). Estes dados dizem respeito aos resultados obtidos aos testes RB, FC e isolamento bacteriológico do agente patogénico em tecidos recolhidos, após o eventual abate sanitário do animal.

Na sua forma não processada, os dados demográficos, sanitários e laboratoriais encontravam-se registados em folhas de campo no formato PDF, para o propósito das intervenções sanitárias da OPP, estando os dois últimos conjuntos de dados agrupados num mesmo relatório. Nestes dados, era frequente a ausência de registos da identificação eletrónica e das datas de vacinação dos animais.

3.2.4. Plataformas de gestão de recursos e saúde animal

As ferramentas de software ao serviço da DGAV consultadas no presente estudo e das quais foram extraídos grande parte dos dados analisados no mesmo foram, como já referido, o PISA.net e o SNIRA.

O PISA.net contém dados relativos à descrição de cada animal quanto à sua espécie, aptidão produtiva, sexo, idade, o seu historial de intervenções sanitárias, a sua identificação, a do seu proprietário e da sua exploração.

Os resultados das provas de diagnóstico são introduzidos no PISA.net por laboratórios credenciados e posteriormente validados e comunicados oficialmente pela DGAV, podendo então as OPP consultar esses resultados. Em qualquer momento, é permitido às OPP a introdução no PISA.net de dados relativos aos efetivos, recolhidos aquando de intervenções junto dos mesmos. Desta forma, é possível a comunicação e colaboração entre estes organismos.

O SNIRA-iDigital é o sistema que estabelece as regras para a identificação, registo (declarações de nascimento) e circulação de diversas espécies animais (entre explorações ou para matadouro), em território português. A entidade que define a informação necessária ao funcionamento do SNIRA é a DGAV e o Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (IFAP) é a entidade responsável pela gestão informática das suas bases de dados. A identificação dos ruminantes é geralmente levada a cabo pelas OPP locais e o registo de existências e deslocações mantido, atualizado e obrigatoriamente comunicado pelos proprietários dos animais ao SNIRA.

3.2.5. Gestão e processamento dos dados

3.2.5.1. Gestão e análise de dados demográficos, sanitários e laboratoriais

Os dados demográficos, sanitários e laboratoriais referentes a cada um dos 7521 animais analisados, foram obtidos a partir do sistema de gestão de saúde animal PISA.net, tendo sido a listagem dos animais presentes nos efetivos analisados posteriormente confirmada com o registo de existências constante no SNIRA. Estes dados foram extraídos do PISA.net sob a forma de documentos em formato PDF, tendo sido manualmente convertidos em ficheiros Excel (Microsoft Excel® 2010), por forma a permitir a sua análise no software R (R Core Team, 2017). Uma vez importados para este software, foi feita a sua transformação e exploração, com o intuito de obter conjuntos de dados analisáveis e dos quais fosse legítimo extrair resultados fidedignos.

A partir dos dados demográficos – data de nascimento, exploração de nascimento e identificação eletrónica do animal – recolhidos no PISA.net, foi também feita uma extrapolação e desta forma obtidas, respetivamente: a idade em meses do animal; a classificação do animal enquanto nativo da exploração ou introduzido na mesma por compra, caso a exploração de nascimento diferisse da exploração em que se este encontrava registado; a classificação do animal enquanto identificado eletronicamente ou não. A idade, em meses, dos animais foi calculada para a data de fevereiro de 2015. Os indivíduos classificados como animais de reposição eram aqueles que apresentavam idade compreendida entre os 6 e os 12 meses, inclusive.

Deste modo, para cada exploração, foi calculada a percentagem de animais de reposição, a percentagem de animais introduzidos no rebanho por compra a outra exploração e a percentagem de animais identificados eletronicamente. Da mesma forma, calculou-se também, ao nível da exploração, a percentagem de machos no efetivo, a percentagem de ovinos destinados à produção de carne, a percentagem de ovinos de produção leiteira e de caprinos (todos os caprinos analisados eram destinados à produção de carne), a percentagem de animais vacinados com a vacina Rev.1 e a percentagem de animais identificados eletronicamente. Em cada exploração foi somado o número total de animais registados, tendo-se assim obtido o tamanho do rebanho, para cada exploração da amostra.

Caso existissem ovinos e caprinos no efetivo animal da exploração, esta era caracterizada como tendo um efetivo animal misto.

3.2.5.2. Gestão e análise de dados dos inquéritos epidemiológicos

As respostas às questões dos IE realizados aos proprietários de cada exploração foram anotadas em papel e posteriormente registadas em documentos Word (Microsoft Word® 2010), para manutenção de um arquivo digital dos IE. Por forma a permitir a análise dos resultados dos IE no software R (R Core Team, 2017), foi feita a conversão manual desses registos para um único ficheiro Excel (Microsoft Excel® 2010). No mesmo ficheiro foi incluída uma variável identificativa da exploração, para permitir a correspondência dos restantes dados relativos a cada exploração, nomeadamente a classificação em “positivo” (caso) ou “negativo” (controlo) que lhe foi atribuída no presente estudo. Com o intuito de facilitar a análise das questões dos IE, agrupou-se as 74 questões dos IE em 60 variáveis.

Após a análise dos resultados dos IE, verificou-se que certas questões apresentavam a mesma resposta entre todas as explorações, não existindo variação, tendo sido, por esse motivo, excluídas da análise. Entre estas questões contavam-se: o regime de produção praticado (semi-extensivo), a ausência de prática de isolamento dos animais introduzidos por compra na exploração, a ausência de desinsetização das instalações usadas pelo efetivo, a ausência de prática de inseminação artificial ou de transferência de embriões, a ocorrência de partos durante todo o ano, o sistemático acesso à água de bebida do efetivo por outros animais, a alimentação das crias com leite materno independentemente da ocorrência de doença na progenitora, a venda de leite dos animais do efetivo, consumo dos produtos animais com origem no próprio efetivo por parte do proprietário.

Outras questões, pelo reduzido número de respostas, tiveram também que ser excluídas desta análise, como sejam, a via de aquisição dos animais e o tipo de pastagem em que o rebanho pastava.

3.2.5.3. Separação perfeita dos dados

Em certas questões dos IE e dados demográficos ocorreu separação perfeita dos dados. Este fenómeno é comum em conjuntos de dados reduzidos, dados do tipo observacional e análises que contemplam variáveis categóricas – o que corresponde ao presente estudo – e consiste na categorização de todas as observações de uma variável explicativa num dos níveis da variável de resposta dicotómica (neste caso, “presença” ou “ausência” de doença) (Agresti, 2002; Zorn, 2005).

Dada a complexidade da resolução desta questão, não foi apresentada, neste estudo, uma resolução da mesma. Contudo, as variáveis consideradas não foram removidas da análise,

sendo os resultados destas análises apresentados conforme obtidos, ainda que a sua adequada interpretação tenha sido, pelo motivo exposto, inviabilizada.

3.2.5.4. Georreferenciação das explorações e construção de mapas

Com as coordenadas geográficas de cada exploração e do mercado de gado de Chaves foi criado um ficheiro Excel (Microsoft Excel® 2010), associando as coordenadas da latitude e longitude ao concelho e freguesia em que estas se situavam, bem como à ME, para sua identificação. Através desta variável, fez-se a correspondência à respetiva classificação para a BPR referente a este estudo.

De acordo com a classificação da exploração foi atribuído um código de cores, na representação das mesmas em mapa, gerado no software R (R Core Team, 2017). Ao mercado de gado foi atribuído uma cor distinta, para sua diferenciação visual.

Para cada concelho e freguesia visitado foi feito um sumário do número de explorações analisadas de cada classificação positiva ou negativa. Posteriormente, com estes dados, construiu-se um mapa ilustrando a percentagem de explorações analisadas, de cada grupo de classificação, em cada freguesia visitada. Estes gráficos, gerados no software R (R Core Team, 2017), foram centrados no ponto correspondente ao centroide do polígono que era a freguesia em questão. Os centroides das freguesias foram calculados no software QGIS (Quantum GIS Development Team, 2017), através dos dados da CAOP, versão de 2014 (CAOP, 2014).

3.2.5.5. Representação gráfica das variáveis quantitativas

Para a representação gráfica das variáveis quantitativas, foi utilizada a estimativa de densidade Kernel (EDK), em alternativa ao histograma, tendo em conta a natureza contínua destas variáveis. Esta técnica não paramétrica permite estimar a função densidade de probabilidade de uma variável, através da soma das funções Kernel (tipicamente gaussianas) K , centradas em dois pontos dos dados, x e x_i ($i = 1, \dots, n$), onde h representa um coeficiente – largura de banda – que controla a estimativa de densidade resultante (Elgammal, Duraiswami, Harwood, & Davis, 2002; Yang, Duraiswami, Gumerov, & Davis, 2003):

$$\hat{f}_h(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n K_h(x - x_i) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x - x_i}{h}\right),$$

A área sob a curva (AUC) corresponde a uma unidade e a probabilidade de um valor se situar entre x e x_i é igual à AUC entre esses dois pontos.

Devido à natureza das distribuições das percentagens de ovinos de carne, ovinos de leite e caprinos, nos efetivos animais estudados, optou-se por não fazer a sua representação gráfica, uma vez que estas eram pouco informativas visualmente.

3.2.5.6. Estudo transversal analítico: classificação de explorações “infetadas” e “não infetadas”

O estudo realizado foi do tipo observacional, tendo por base um conjunto de explorações que foram, depois de realizados os IE, categorizadas em “infetadas” e “negativas” com vista a permitir o estudo analítico de comparação e identificação dos fatores de risco.

3.2.5.6.1. Classificação das explorações

A partir dos resultados do teste FC foi estabelecido um diagnóstico para cada animal, de acordo com o disposto no anexo C da Diretiva 91/68/CEE e tendo em conta os títulos ao mesmo teste: o diagnóstico seria positivo, caso o animal registasse títulos superiores ou iguais a 20 UI/ml e seria negativo, caso registasse títulos inferiores a esse valor.

Seguidamente, organizou-se os resultados do teste FC em rondas, a partir da data de emissão dos mesmos no PISA.net e somou-se o número de animais com diagnóstico positivo em cada ronda, para cada exploração.

De acordo com os critérios do presente estudo, a uma dada exploração era atribuída uma classificação para BPR – positiva, duvidosa ou negativa – de acordo com o número de animais positivos no primeiro rastreio de diagnóstico, o estatuto vacinal dos animais positivos nessa primeira ronda e o número de animais positivos na reinspeção do efetivo (Tabela 1).

Posteriormente, procedeu-se à confirmação da classificação atribuída através da análise dos resultados de isolamento bacteriológico *post-mortem* de *B. melitensis* – sempre que este fosse positivo, era atribuída a classificação de “infetada” para BPR, independentemente dos resultados ao teste FC. O resultado da primeira classificação é apresentado na Tabela 2.

Tabela 1. Critérios para a atribuição de classificação para a BPR às explorações do conjunto amostral do presente estudo.

1º controlo: nº animais positivos	Estado vacinal dos positivos	2º controlo: nº animais positivos	Positiva	Duvidosa	Negativa
0	–	–			X
1	Sim	0		X	
1	Sim	1	X		
1	Não	0		X	
1	Não	1	X		
2	Todos vacinados	0		X	
2	Todos vacinados	1	X		
2	≥ 1 não vacinado	0		X	
2	≥ 1 não vacinado	1	X		
Entre 3 e 5	Todos vacinados	0		X	
Entre 3 e 5	Todos vacinados	1	X		
Entre 3 e 5	≥ 1 não vacinado	–	X		
Mais de 5	–	–	X		

Tabela 2. Descrição quantitativa inicial da amostra de explorações de pequenos ruminantes visitada, agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

	Número	%
Número total de explorações visitadas	88	100,00%
Classificação de BPR		
Número total de explorações negativas	57	64,77%
Número total de explorações positivas	23	26,14%
Número total de explorações duvidosas	8	9,09%

Notas: serve a presente tabela para ilustrar quantitativamente a distribuição das explorações da amostra por classificação de BPR do estudo, anteriormente à reclassificação das explorações duvidosas.

Uma vez que as provas serológicas utilizadas no diagnóstico da brucelose não apresentam sensibilidade e especificidade perfeitas e que, em ambiente vacinal, podem surgir resultados serológicos positivos transitórios que não são devidos a infeção, mostrou-se necessário estabelecer com maior certeza os grupos de explorações negativas à brucelose e infetadas, para efeito do estudo dos fatores de risco, analisando o grupo das “duvidosas” com vista a estabelecer qual o perfil destas explorações. Para tal, foi realizada uma análise de sensibilidade a cada uma das variáveis independentes, onde as explorações duvidosas foram agrupadas ou às negativas ou às positivas e através do teste de Fisher analisada a significância da diferença entre os 2 grupos, nas várias combinações (Tabela 3).

Após a realização destas múltiplas análises, verificou-se que as explorações duvidosas se assemelhavam mais às explorações positivas (Anexo V). Por esta razão, procedeu-se à reclassificação das 8 explorações duvidosas da amostra como explorações positivas a BPR, sendo o resultado final 31 explorações classificadas como positiva (caso) e 57 como negativa (controlo).

Tabela 3. Esquema representativo das combinações de grupos de explorações comparadas através do teste de Fisher, para reclassificação das explorações duvidosas.

Grupo de explorações controlo	Grupo de explorações caso
Conjunto das explorações negativas	Conjunto das explorações duvidosas
Conjunto das explorações duvidosas	Conjunto das explorações positivas
Conjunto das explorações negativas	Conjunto das explorações duvidosas e positivas
Conjunto das explorações duvidosas e negativas	Conjunto das explorações positivas
Conjunto das explorações negativas	Conjunto das explorações positivas

3.2.5.6.2. Análise univariada dos fatores de risco

Na análise de fatores de risco associados à ocorrência de BPR nos efetivos animais, a variável de resposta categórica correspondia à classificação de BPR obtida neste estudo de acordo com os critérios referidos e as variáveis independentes correspondiam aos dados demográficos e sanitários dos efetivos de pequenos ruminantes estudados e aos dados obtidos em IE ao proprietário dos mesmos.

Foi utilizado o teste de Fisher para analisar a existência de relações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a classificação de BPR dos efetivos animais e as variáveis qualitativas independentes.

Para a comparação de médias das variáveis quantitativas, entre os grupos de explorações positivas e negativas, foi utilizado o teste-T de Student para duas amostras. Com o intuito de averiguar a validade dos resultados do teste-T, examinou-se a normalidade das distribuições das variáveis quantitativas em ambos os grupos de explorações (negativas e positivas), através do teste de Shapiro-Wilk e interpretação visual de gráficos quantil-quantil (gráficos Q-Q). Verificando-se a ausência de normalidade nas distribuições das variáveis quantitativas em

estudo recorreu-se, como alternativa não paramétrica ao teste-T de Student para duas amostras, ao teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, com o propósito de investigar a existência de diferentes distribuições, com diferentes medianas, entre os grupos de explorações negativas e positivas.

Posteriormente, as variáveis quantitativas foram categorizadas em variáveis qualitativas, por forma a poderem ser sujeitas ao teste de Fisher (Anexo VI e Anexo VII). A divisão destas variáveis em classes foi realizada procurando obter um reduzido número de classes, atendendo à distribuição das mesmas e tentando promover o sentido biológico. De entre as diversas categorizações aplicadas às variáveis quantitativas, foi selecionada aquela que permitia melhor diferenciar explorações positivas e negativas (Anexo VI e Anexo VII).

Com o intuito de descrever quantitativamente a associação entre as diversas variáveis independentes e a classificação de BPR do estudo analisou-se o *Odds-ratio* (OR) das mesmas. De entre as múltiplas variáveis correspondentes às questões dos IE, foram selecionadas para a referida análise aquelas que, do ponto de vista epidemiológico, permitiam caracterizar o risco de transmissão da BPR entre animais e explorações.

Finalmente, foi calculada, para cada variável independente, a percentagem de explorações em que se verificava a presença do fator de risco (Anexo VI e Anexo VII) em causa e de doença, simultaneamente.

Esta análise permitiu ainda selecionar os fatores com diferenças estatisticamente significativas entre explorações positivas e negativas, que foram depois utilizados no modelo de regressão logística.

3.2.5.6.3. Análise multivariada dos fatores – Regressão logística

Do conjunto de variáveis sujeitas à análise de significância foram selecionadas as que apresentavam relações estatisticamente significativas (ao teste de Fisher e *Odds-ratio*) com a classificação de BPR dos efetivos animais. A partir destas variáveis foi construído um modelo explicativo da diferença entre explorações positivas e negativas, recorrendo à regressão logística múltipla com variável de resposta dicotómica (Anexo VIII).

Para uma correta interpretação dos resultados da regressão logística é importante referir que as estimativas fornecidas por este tipo de análise caracterizam a relação entre a variável de resposta dicotómica e as variáveis explicativas numa escala de *log-odds*. Com o intuito de interpretar de forma mais prática os resultados, recorreu-se à função exponencial para calcular os *Odds-ratio* de cada variável explicativa – e^{β} , onde e é a função exponencial e β é a estimativa (Houe, Ersbøl & Toft, 2004).

Partindo do modelo completo, removeu-se uma das variáveis, por não contribuir para a explicação da diferença entre explorações positivas e negativas, criando assim um modelo explicativo reduzido (Anexo VIII).

Neste estudo, para a identificação das variáveis com influência significativa na ocorrência de doença, recorreu-se ao modelo de regressão logística de eliminação regressiva (*backward elimination logistic regression*) (Anexo VIII).

A estratégia de eliminação regressiva parte de um modelo completo (com todas as variáveis consideradas). No primeiro passo, a variável menos significativa é excluída e a seguinte variável a excluir será a menos significativa das restantes. Este processo repetir-se-á até que todas as variáveis no modelo sejam significativas (Houe et al., 2004).

Os modelos com menos parâmetros, denominados modelos encaixados ou reduzidos, representam alternativas plausíveis com base no que é conhecido ou na hipótese sobre a ocorrência e transmissão de BPR entre rebanhos (Burnham & Anderson, 2002).

Capítulo 4. RESULTADOS

4.1. Avaliação das atividades de saneamento

4.1.1. Atuação das OPP e Serviços Oficiais

Ao acompanhar os técnicos da OPP no decorrer das atividades de saneamento, verificou-se que estes não adotavam práticas corretas de biossegurança à entrada nas explorações, na execução da vacinação (Anexo IX – Figura 21 e Figura 31) e na comunicação com os proprietários dos efetivos, demonstrando também um preocupante desconhecimento das características da BPR, que comunicavam na forma de factos incorretos, aos proprietários dos efetivos.

Prática de Biossegurança:

Para as deslocações às explorações de pequenos ruminantes, a brigada da OPP usava um automóvel comercial ligeiro. Nunca foi observado qualquer tipo de prática de biossegurança envolvendo o referido veículo, que nunca foi sujeito a limpeza ou desinfecção interior ou exterior, apesar de transitar entre explorações (qualquer que fosse o seu estatuto sanitário) e de entrar nas explorações, acumulando resíduos nos rodados.

Da mesma forma, o vestuário utilizado pelos técnicos da OPP (botas de borracha e fato-macaco) não era substituído entre explorações intervencionadas e a limpeza que, apenas por vezes lhe era feita, resumia-se à passagem das botas de borracha pela vegetação e acumulações de água da exploração. Nunca foi feita a lavagem deste vestuário durante o período de estágio curricular, nem feita a correta limpeza e desinfecção das botas, que visualmente acumulavam resíduos.

Verificava-se a mesma ausência de práticas de biossegurança e higiene no que se referia ao vestuário dos técnicos da DSAVR Norte e aos veículos utilizados para levantamento de animais positivos. Estes animais eram encaminhados para abate sanitário, em matadouro, no mesmo dia em que eram recolhidos da exploração. Após a sua entrega ao matadouro não eram aplicadas as boas práticas de higiene dos transportes.

Nem os técnicos da DSAVR Norte, nem os técnicos da OPP utilizavam equipamento de proteção pessoal completo no decorrer das suas atividades: utilizavam luvas descartáveis, fatos-macaco e botas, mas nunca máscaras ou óculos de proteção (os últimos, recomendados para a aplicação da vacina Rev.1).

Vacinação:

Os animais jovens eram vacinados pelos técnicos da OPP local, geralmente no mesmo dia em que eram identificados. Por esta razão verificava-se frequentemente, para cada animal, um dos seguintes cenários, aquando da aplicação da vacina Rev.1:

- Se o animal apresentava a idade correta para a vacinação (entre os 3 e os 6 meses de idade), era identificado com a idade real e vacinado;
- Se o animal apresentava idade ligeiramente superior à recomendada para a vacinação, era-lhe registada uma idade inferior à real na identificação e era vacinado;
- Se o animal apresentava idade muito superior à recomendada para a vacinação, era identificado com a idade real e não era vacinado (por forma a evitar a aplicação de coimas).

Assim sendo, observaram-se irregularidades na aplicação da vacina Rev.1, como sejam:

- Não cumprimento do prazo de validade da vacina Rev.1 (6 horas após a reconstituição);
- Aplicação da vacina nos espaços desprotegidos do vento e/ou utilizados pelo rebanho;
- Não utilização de equipamento de proteção pessoal por parte dos proprietários na manipulação dos animais aquando da aplicação da vacina Rev.1 e não utilização de equipamento de proteção pessoal total pelos técnicos da OPP;
- Aplicação descuidada da vacina – por vezes a gota não era administrada no olho do animal, caindo no chão ou pele do mesmo (Anexo IX – Figura 21), não sendo o processo repetido no outro olho do animal.

4.1.2. Caracterização do manejo das explorações

Em Trás-os-Montes a produção de pequenos ruminantes é maioritariamente feita em regime semi-extensivo, sendo os animais destinados sobretudo à produção de carne. O manejo das explorações estava geralmente a cargo do proprietário e eventualmente a alguns familiares próximos.

A exploração-tipo desta região consistia num curral construído em pedra, tijolo, bloco de betão ou madeira e telhado de telha ou fibra de vidro, frequentemente situado próximo da habitação do proprietário do rebanho (Anexo IX – Figura 22). O curral era geralmente de pequenas dimensões (tendo em conta a reduzida dimensão média dos rebanhos) embora existissem também, em menor número, grandes pavilhões (Anexo IX – Figura 23) ou infraestruturas mais rudimentares (Anexo IX – Figura 24). Num reduzido número de explorações, o rebanho pernoitava na pastagem, dentro de cercados, nunca sendo estabulado. Em certas explorações, os animais eram alojados em currais distintos, mas próximos, separados por espécie, enquanto que num pequeno número de explorações da amostra, era feita a distribuição dos animais por

currais localizados a grande distância, colocando a dúvida se de facto pertenceriam ao mesmo proprietário.

O material usado para cama, dentro do curral, era normalmente a palha ou carqueja. O espaço interior dispunha frequentemente de zonas separadas do espaço comum, destinadas ao isolamento de fêmeas recém-paridas com as suas crias, apenas das crias, de animais doentes, ou para separação de animais aquando das intervenções sanitárias.

Em muitos currais observavam-se más condições higiénicas (Anexo IX – Figura 25) e era rara a prática de uma correta e frequente desinfeção deste espaço. Os produtos de desinfeção mais frequentemente utilizados pelos proprietários eram lixívia, creolina, cal e enxofre.

O alimento era fornecido aos animais em comedouros colocados dentro do curral e era geralmente armazenado fora do alcance dos animais. Em alguns casos, era inclusivamente armazenado em espaços destinados ao isolamento de fêmeas parturientes constituindo risco de contaminação do alimento destinado ao rebanho com produtos de parto/aborto (Anexo IX – Figura 26).

A água de bebida raramente era fornecida aos animais em bebedouros, pois estes obtinham-na em lameiros e, por vezes, em riachos ou tanques/fontes públicas (Anexo IX – Figura 27). Nas poucas explorações em que existiam bebedouros, estes encontravam-se geralmente acessíveis a outros animais.

Muitos proprietários das explorações de pequenos ruminantes (inclusivamente explorações positivas) vendiam o feno ou forragem excedente das suas pastagens a outras explorações.

Os tipos de pastagens utilizados pelos efetivos animais eram vários: pastos do proprietário ou arrendados, terrenos baldios ou mato das zonas florestais. Quando o poder económico do proprietário do efetivo era reduzido, ou quando as pastagens se situavam longe do curral (o que se confirmava num grande número de explorações), era comum a utilização de terrenos baldios e/ou mato como pastagem, num raio de vários quilómetros em redor da exploração. Aliado ao facto de que só era garantida a exclusividade de pastagem em terrenos próprios e arrendados, era extremamente comum a partilha de pastagem com outros rebanhos e o contacto com espécies silváticas.

4.1.3. Caracterização dos contactos com outros animais

Dado que a maioria das explorações visitadas se localizava em zonas rurais – perto ou em Zonas de Caça Associativa –, o contacto (direto ou indireto) com espécies silváticas suscetíveis à BPR era frequentemente reportado pelos proprietários, sendo que alguns referiam inclusivamente que o seu rebanho já tinha sido vítima de ataques por lobos ibéricos (*Canis lupus signatus*). Entre as outras espécies indicadas pelos produtores contava-se: javali (*Sus*

scrofa scrofa), cabra-montês (*Capra pyrenaica*), raposa (*Vulpes vulpes*), corço (*Capreolus capreolus*) ou veado (*Cervus elaphus*).

Por outro lado, nas zonas periurbanas, havia uma grande população de cães errantes que, segundo alguns proprietários, por vezes atacavam os rebanhos, tendo chegado a matar animais dos efetivos. Estas populações errantes podem atuar como vetores mecânicos, transportando materiais contaminados entre explorações.

Para garantir a segurança do rebanho e para auxiliar o proprietário nas deslocações do rebanho, praticamente todas as explorações tinham cães (com frequência vários), que contactavam proximamente com o rebanho, não raras vezes pernoitando inclusivamente com o mesmo. Este contacto próximo e constante facilitava-lhes o acesso a produtos de parto, abortos ou nados-mortos e, dadas estas condições, mesmo que o proprietário não lhes fornecesse (era frequente o proprietário fornecer deliberadamente estes produtos aos seus cães), era impossível impedir que os cães os consumissem, tendo sido observado múltiplas vezes este acontecimento (Anexo IX – Figura 28) ou vestígios do mesmo (Anexo IX – Figura 29 e Figura 30).

Uma vez que a grande maioria dos proprietários tinha como principal ocupação a agropecuária de nível familiar, era extremamente comum a presença de animais de outras espécies domésticas na exploração, muitas das quais suscetíveis a BPR, que tinham contacto próximo com os pequenos ruminantes. Entre estas espécies contavam-se: equinos (*Equus ferus caballus*), asininos (*Equus africanus asinus*), suínos (*Sus scrofa domesticus*), bovinos (*Bos taurus*) e felinos (*Felis catus*).

Aquando da visita às explorações, era frequente a presença de amigos ou familiares do proprietário, que auxiliavam nas intervenções sanitárias, separando e segurando os animais para que fossem intervencionados. Num menor número de explorações (com maior poder económico), era contratada mão-de-obra para auxiliar no manejo geral da exploração.

4.1.4. Cooperação dos proprietários das explorações

Os proprietários das explorações visitadas eram, na sua grande maioria, pessoas com baixo nível de escolaridade e até analfabetos. Era comum referirem que toda a sua vida estiveram ligados à produção de pequenos ruminantes, pelo que se constatava a presença de práticas muito enraizadas e uma grande relutância em aceitar qualquer alteração às mesmas. Tal facto, aliado à profunda falta de conhecimentos relativos às características da BPR, gerava frequentemente discórdia com os serviços veterinários da OPP ou da DSAVR Norte. A intenção destas instituições era, por vezes, questionada pelos proprietários das explorações. Havia casos de produtores que não acreditavam na existência da doença, uma vez que os seus

animais não apresentavam sinais clínicos e, por isso, acusavam os serviços da OPP ou DSAVR Norte de quererem ficar com os seus animais.

Consequentemente, os proprietários das explorações mostravam-se desconfiados em relação a médicos veterinários e aquando da realização dos IE, foi necessário assegurar que as informações fornecidas seriam confidenciais, sendo mesmo assim frequente verificar-se que forneciam informações incorretas.

Contudo, alguns proprietários, apesar de não se encontrarem sensibilizados para a problemática da BPR, mostravam-se interessados em aprender.

Verificou-se, todavia, que apesar do igual desconhecimento das características da BPR, os proprietários com um maior poder económico geralmente apresentavam melhores condições de manejo de higiene.

4.1.5. Práticas de risco para a transmissão da brucelose

Tendo em conta a relutância dos proprietários em colaborar com os serviços veterinários e o seu desconhecimento das características da BPR, era comum a realização de práticas de risco para a transmissão da doença às pessoas envolvidas no manejo da exploração. As mais frequentemente observadas foram:

- A não utilização de qualquer equipamento de proteção pessoal na manipulação dos animais - inclusivamente em explorações positivas (algumas com presença de abortos) e aquando da aplicação da vacina Rev.1 (Anexo IX – Figura 21 e Figura 31);
- A prática de ordenha manual e fabrico e consumo de produtos lácteos não pasteurizados e o contacto próximo com animais doentes;
- Fornecimento de leite, carcaças, fetos ou produtos de aborto e secundinas de pequenos ruminantes do efetivo aos cães – tendo sido também visto um cão de uma exploração a ingerir fezes dos mesmos animais (Anexo IX – Figura 32);
- Partilha de machos reprodutores entre diferentes rebanhos;
- Estabulação conjunta de animais de diferentes espécies com o efetivo da exploração;
- Transações irregulares de pequenos ruminantes.

As transações de pequenos ruminantes nesta região eram extremamente frequentes e processavam-se entre diferentes agentes, tendo os animais diferentes destinos: venda direta ao consumidor final, compra e venda direta entre proprietários de explorações de pequenos ruminantes (como animais de substituição e sobretudo entre explorações vizinhas), compra e venda no mercado de gado, compra e venda a negociante de gado e venda para abate em matadouro. Era frequente a venda para diferentes destinos numa mesma exploração.

Das transações referidas, as de maior importância do ponto de vista epidemiológico consistiam nas que envolviam um negociante de gado. Os negociantes eram também proprietários de explorações de pequenos ruminantes, pelo que apesar de operarem como intermediários entre explorações de pequenos ruminantes, registavam os animais que compravam na sua exploração, onde os mantinham antes de os venderem a outras explorações ou para matadouro. Estes agentes compravam e vendiam animais a um grande número de explorações, sendo extremamente frequente confirmar, por IE, que um dos compradores dos animais das explorações analisadas incluía o negociante de gado. A confluência de animais de diferentes origens numa mesma exploração, anteriormente a serem vendidos a outras explorações, representava um grande risco para a transmissão de BPR entre explorações, caso as origens ditas indemnes já não o fossem ou caso existissem transações de risco não declaradas.

De entre os negociantes de gado a operar na rede de contactos das explorações analisadas, um destacava-se por estabelecer transações com quase a totalidade dos proprietários que recorriam a esta via de aquisição ou venda de pequenos ruminantes (segundo o reportado pelos proprietários inquiridos). A exploração deste negociante foi visitada para recolha de animais positivos destinados a abate sanitário, o que indica um enorme risco de transmissão de BPR para as explorações da sua rede de contactos. Embora não tenha sido analisada a origem da infeção desta exploração no presente estudo, foi relatado pelos técnicos da OPP local que este negociante havia, no passado, comprado animais de explorações que se sabiam ser positivas e que havia também recusado vacinar o seu efetivo, tendo começado a reportar abortos pouco tempo depois. O mesmo foi confirmado em IE a pelo menos 3 proprietários de explorações de pequenos ruminantes positivas e sob sequestro (analisadas neste estudo), tendo estes referido que tinham vendido recentemente animais seus ao mesmo negociante.

Os técnicos da OPP não se mostraram alerta para a influência desta exploração na transmissão de BPR entre as explorações a seu cargo. Quando questionados por proprietários sobre onde adquirir pequenos ruminantes para recria, era frequente os técnicos da OPP sugerirem o referido negociante como vendedor.

Quando foi realizado o IE a este negociante, verificou-se que o mesmo forneceu informações falsas, nomeadamente sobre a presença de animais na sua exploração que não estavam identificados.

4.1.6. Irregularidades sanitárias observadas

No decorrer das visitas às explorações, ao longo do estágio curricular, verificou-se que vários proprietários não cumpriam certos preceitos legais que lhes eram exigidos ou que recorriam a

práticas de risco do ponto de vista sanitário. Estas foram confidencialmente registadas em relatório, quando observadas na exploração ou relatadas pelo proprietário em conversa.

Este tipo de infrações foi registado em 18 das 88 explorações visitadas. Destas 18 explorações, 11 estavam no grupo de explorações consideradas como “positivas” e 7 estavam no grupo “negativas”, de acordo com os critérios definidos no presente estudo.

Entre as falhas ao cumprimento das obrigações legais impostas ao produtor e exploração, contava-se:

- **Violação do sequestro sanitário aplicado à exploração (registado em 7 explorações da amostra – 7,95%):** em explorações de classificação sanitária oficial B2.1, houve conhecimento verbal de que certos proprietários vendiam animais a terceiros, para consumo ou recria, de forma não oficial. No mesmo tipo de explorações, por vezes simultaneamente, também eram comprados animais jovens, de forma não oficial, para incorporação no efetivo como animais de substituição (sendo registados como nascidos na exploração). Verificou-se também que certas explorações de classificação sanitária oficial B2.1 e B2 vendiam cordeiros a terceiros para consumo.
- **Recusa de identificação de animais do efetivo (8 explorações – 9,09%):** alguns proprietários não permitiam a identificação de certos animais do seu rebanho, quer por brinco, quer por bolo reticular. Era extremamente frequente observar a presença, na exploração, de pequenos ruminantes adultos sem brinco nos rebanhos e até de bovinos, em alguns casos. Verificou-se inclusivamente numa exploração que o proprietário tinha cortado os pavilhões auriculares de alguns animais, na tentativa de que não fossem identificados. Constatou-se também que muitos proprietários consideravam que a identificação eletrónica dos seus animais lhes poderia causar a morte. Mesmo informados de que poderiam perder direito à atribuição de ajudas e prémios à produção, os proprietários mantinham a decisão de não identificar os seus animais.
- **Recusa de intervenção sanitária (3 explorações – 3,41%):** certos proprietários, alguns de explorações positivas a BPR, não permitiam que determinados animais fossem sujeitos a colheita de sangue ou vacinação.
- **Registos fraudulentos (8 explorações – 9,09%):** em certas explorações sob sequestro sanitário, os proprietários compravam animais que eram registados em nome de terceiros, pertencendo na verdade aos proprietários deste tipo de explorações, onde os animais eram mantidos. Foi também confirmado que existiam explorações em nome de terceiros, apenas para seu registo oficial, aos quais não pertenciam na verdade. Verificou-se que, em certos casos, era declarada a morte ou desaparecimento de animais que se encontravam vivos e presentes na exploração, aquando das

intervenções sanitárias. Confirmou-se igualmente a ocorrência de trocas de brincos entre animais, em algumas explorações.

- **Coabitação de animais de diferentes explorações (5 explorações – 5,68%):** constatou-se que, por vezes, familiares, amigos ou vizinhos, detentores de diferentes explorações, partilhavam o mesmo curral com uma exploração B2.1. Os proprietários destas explorações ocultavam esta informação dos médicos veterinários da DSAVR Norte, quando sujeitos a IE oficial. Por outro lado, muitos proprietários referiam a presença de animais, com ou sem brinco, no seu efetivo, que se tinham perdido de outros rebanhos e que tinham acabado por seguir o seu – o que poderia consistir num argumento para encobrir práticas ilegais. Outra justificação, apresentada por um proprietário, para a coabitação de animais de diferentes origens era a sua utilização para limpeza de pastagens.
- **Transações ilegais (7 explorações – 7,95%):** verificava-se a prática regular de transações ilegais (não declaradas) de animais entre diferentes explorações, independentemente do seu estatuto sanitário, quase como uma tradição cultural. Estas transações eram feitas diretamente entre proprietários, por forma a evitar a fiscalização das autoridades competentes e sem qualquer tipo de registo ou documentação. Algumas explorações recebiam animais jovens oriundos de outras, quando as progenitoras não os podiam criar, não existindo qualquer registo desta transação.
- **Incorreta eliminação de cadáveres (2 explorações – 2,27%):** em certas explorações, houve conhecimento da prática de uma incorreta eliminação de cadáveres de animais do efetivo, quer pela colocação de fetos em contentores de lixo municipais, quer pelo abandono ou enterro dos cadáveres em baldios ou floresta. Num dos casos confirmou-se que o proprietário não recorreu aos serviços do SIRCA por ter animais não registados na exploração.

Por outro lado, verificou-se que o incumprimento de legislação e das determinações do programa de erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes não era alvo de denúncia pela OPP aos Serviços Oficiais uma vez que os proprietários têm a possibilidade de mudar de OPP.

4.1.7. Perspetivas dos proprietários relativamente às irregularidades sanitárias praticadas e conhecimentos sobre brucelose

Tendo em conta o reduzido nível de instrução e poder económico da grande maioria dos proprietários inquiridos neste estudo, muitos referiam depender financeiramente dos subsídios atribuídos aos seus animais como principal fonte de rendimento. Desta forma, muitos

proprietários comentavam ter dificuldades económicas em manter o rebanho, atendendo os custos implicados no cumprimento de todas as exigências legais (identificação, vacinação, guias de trânsito, etc.), necessárias para atribuição dos subsídios. Assim sendo, muitos dos proprietários das explorações de pequenos ruminantes analisadas optavam por proceder a transações não declaradas diretamente uns aos outros, por forma a evitar estarem sujeitos a fiscalização pelas autoridades competentes.

Pelos motivos referidos, os proprietários recusavam o saneamento e identificação dos animais destinados a venda, uma vez que representava um investimento do qual não reconheciam vantagens, já que esses animais não seriam mantidos na sua exploração; desta maneira, era-lhes facilitada a transação não oficial destes animais, que não se encontravam registados na exploração.

Nesta região especialmente afetada pela BPR e onde a produção de pequenos ruminantes é o modo de vida de muitos dos seus habitantes, a brucelose representa, naturalmente, um importante problema de saúde pública. Contudo, através de relatos de vários proprietários das explorações analisadas, que se tinham contagiado com brucelose no passado, constata-se que a consciência da importância desta doença, enquanto problema de saúde pública, é ainda reduzida, tanto por parte da população em geral, como pelos serviços de saúde.

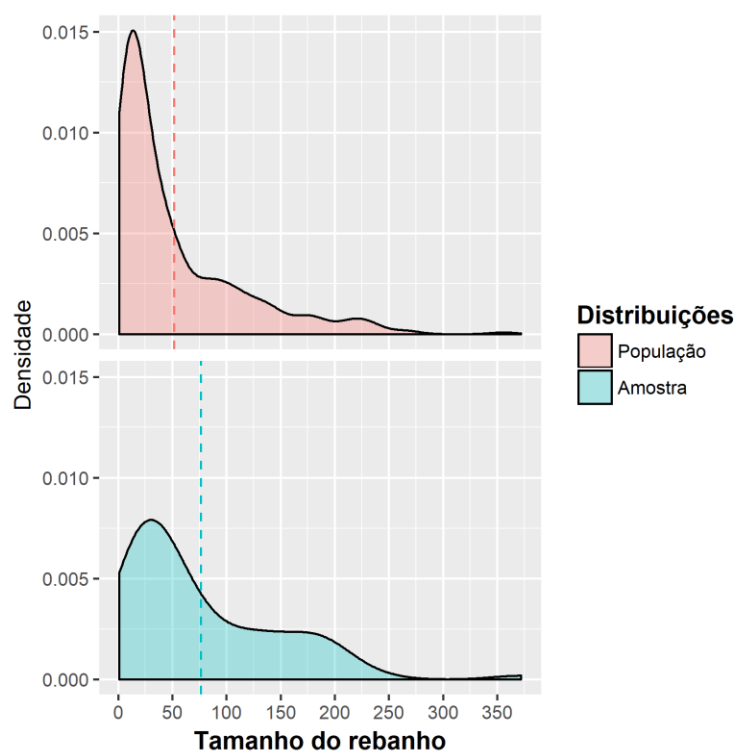
Efetivamente, vários proprietários de rebanhos da amostra relataram ter-se apresentado aos serviços de saúde locais com sintomas que pensavam ser de brucelose sem que lhes tivesse sido feito um diagnóstico ou pedidas análises para pesquisa de anticorpos para o agente. Nos casos descritos, o tempo decorrido desde a primeira consulta até ao diagnóstico tinha sido excessivamente prolongado, mesmo vários meses, mantendo a sintomatologia; constatou-se que o diagnóstico só tinha sido obtido após análise sugerida pelo doente, apresentando já resposta serológica exuberante. Os proprietários supostamente afetados referiram que tinham sido alertados para a possibilidade de se tratar de brucelose humana por amigos ou familiares que já teriam tido a doença e reconheciam a sintomatologia.

4.2. Estudo dos fatores de risco ao nível da exploração

4.2.1. Comparação entre a amostra do estudo e os dados populacionais

Com vista a avaliar a representatividade da amostra trabalhada (criadores visitados no período de estágio, a quem foi aplicado o IE) foi comparada a dimensão do rebanho na fração da amostra relativa ao concelho de Chaves com a população total deste concelho, uma vez que existiam dados populacionais sobre o mesmo. As distribuições da dimensão do rebanho para a amostra e para a população foram representadas graficamente, utilizando a EDK (Figura 4).

Figura 4. EDK da dimensão dos rebanhos, para a população de explorações de pequenos ruminantes de Chaves e amostra de explorações visitadas em Chaves; a média de cada grupo é representada a tracejado.



Conclui-se que a média da dimensão dos rebanhos era superior na amostra ($\bar{x} = 76,20$) quando comparada com a população ($\mu = 51,44$). Em ambas era mais frequente a existência de rebanhos de menor dimensão, apesar de na população a proporção destes ser superior à da amostra. O número de animais por exploração mais frequente na população de Chaves era 12 animais e na amostra 20 animais.

4.2.2. Caracterização dos efetivos pecuários da amostra

No decorrer do acompanhamento das intervenções sanitárias e recolhas de animais para abate sanitário, ao longo do estágio curricular, foi analisada uma amostra de 7521 pequenos ruminantes. A grande maioria destes eram fêmeas e a espécie mais representada a ovina. Os caprinos eram frequentemente parte integrante de efetivos mistos, sendo que nestes a espécie mais prevalente era, geralmente, a ovina. Praticamente todos os animais desta amostra eram destinados à produção de carne, com a exceção de um reduzido número de ovinos de aptidão produtiva leiteira, mantidos num efetivo em conjunto com animais de diferente aptidão produtiva (Tabela 4 e Tabela 6).

Tabela 4. Descrição quantitativa das características da amostra animal analisada.

	Número	%
Número total de animais	7521	100
Sexo		
Número total de fêmeas	7243	96,30
Número total de machos	278	3,70
Espécie		
Número total de ovinos	6687	88,91
Número total de caprinos	834	11,09
Aptidão produtiva		
Número total de ovinos leiteiros	11	0,15
Número total de ovinos de carne	6676	88,76

Notas: todos os caprinos eram destinados à produção de carne.

A amostra de pequenos ruminantes analisada encontrava-se distribuída por 88 explorações que, segundo os critérios definidos no presente estudo, foram classificadas em “positivas” (ou caso) e “negativas” (ou controlos). Em maior representatividade, encontravam-se as explorações negativas (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição quantitativa final da amostra de explorações de pequenos ruminantes visitada, agrupadas por classificação de BPR do estudo.

	Número	%
Número total de explorações visitadas	88	100
Classificação de BPR		
Número total de explorações negativas	57	64,77
Número total de explorações positivas	31	35,23

Quanto à constituição dos efetivos analisados, no que respeita à espécie dos animais, o tipo de rebanho predominante era o dos que tinham ovinos na sua constituição, seguido pelo grupo de rebanhos constituído apenas por ovinos. O número de efetivos mistos era superior ao número de efetivos apenas com caprinos. Relativamente à aptidão produtiva dos animais, verificou-se que apenas uma exploração continha animais de destinados à produção leiteira – da espécie ovina – e que todos os caprinos eram destinados à produção de carne (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição da constituição dos diferentes tipos de rebanhos analisados, por espécie e aptidão produtiva.

Constituição do efetivo		Número	%
Espécie	Aptidão produtiva		
Ovina	Presença de ovinos leiteiros*	1	1,14
	Apenas ovinos de carne	53	60,23
Caprina	Apenas caprinos de carne**	15	17,05
Rebanho misto	Rebanho misto de ovinos e caprinos de carne**	19	21,59
Total		88	100

Notas: * no rebanho em que existiam ovinos leiteiros, existiam também ovinos de carne; ** todos os caprinos da amostra analisada eram destinados à produção de carne.

As explorações de pequenos ruminantes visitadas encontravam-se dispersas por três concelhos do distrito de Vila Real – Chaves, Valpaços e Boticas. As explorações desta amostra foram georreferenciadas, juntamente com o mercado de gado de Chaves, tendo-se constatado que se encontravam distribuídas, em maior número, pelas freguesias do concelho de Chaves, seguindo-se o concelho de Valpaços e, em menor número, pelo concelho de Boticas, onde foram visitadas apenas duas explorações (Figura 5, Figura 6, Anexo X e Anexo XI).

Na amostra de explorações de Chaves, o grupo das explorações negativas era o maior. As explorações positivas eram as menos representadas neste concelho, apesar de no mesmo se encontrar o maior número de explorações desta classificação, comparativamente a Valpaços e

Boticas. Em Valpaços, não foram visitadas explorações negativas (Figura 5, Figura 6, Anexo X – Figura 34 e Anexo XI).

Na amostra estudada, a freguesia que registou maior número de explorações (sendo a maioria destas explorações negativas) foi São Pedro de Agostém, concelho de Chaves, seguida da freguesia de Águas Frias, concelho de Chaves, tendo esta freguesia apenas explorações negativas (Figura 5, Figura 6, Anexo X – Figura 33 e Anexo XI).

Em certas freguesias, como Cela, Eiras, Moreiras, entre outras, foi visitada apenas uma exploração. Noutras freguesias, como Águas Frias, Ervededo, Lama de Arcos, entre outras, foram visitadas várias explorações e estas apresentavam a mesma classificação de BPR (Figura 5, Figura 6, Anexo X e Anexo XI).

Em 6 das 9 freguesias em que existiam explorações duvidosas existiam simultaneamente explorações duvidosas (posteriormente consideradas positivas) e explorações positivas.

Figura 5. Mapa das freguesias dos concelhos de Chaves, Valpaços e Boticas, indicando a georreferenciação das explorações de pequenos ruminantes visitadas (amostra) e do mercado de gado. O código de cores indica a classificação de BPR da exploração e diferencia o mercado das explorações.

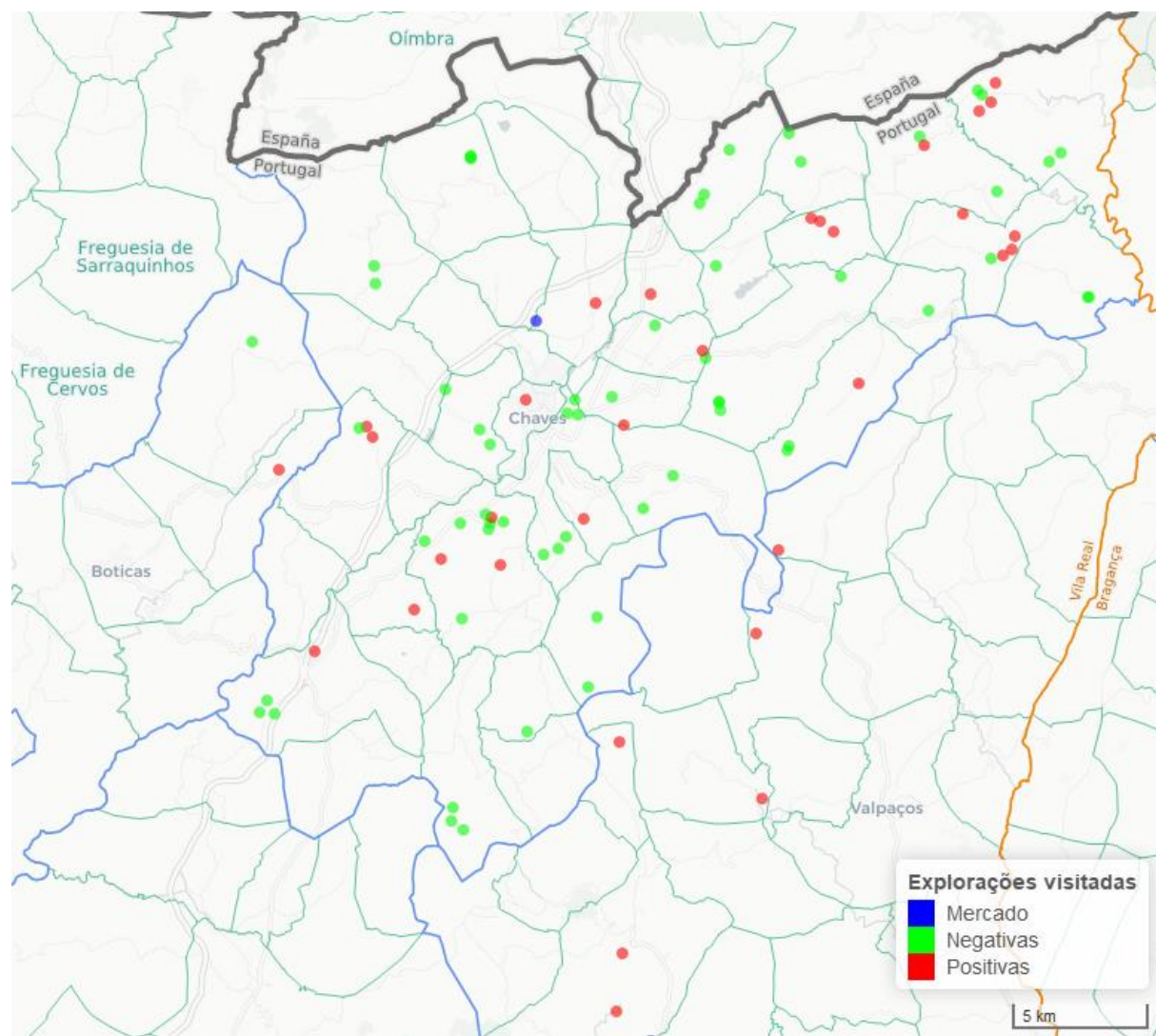
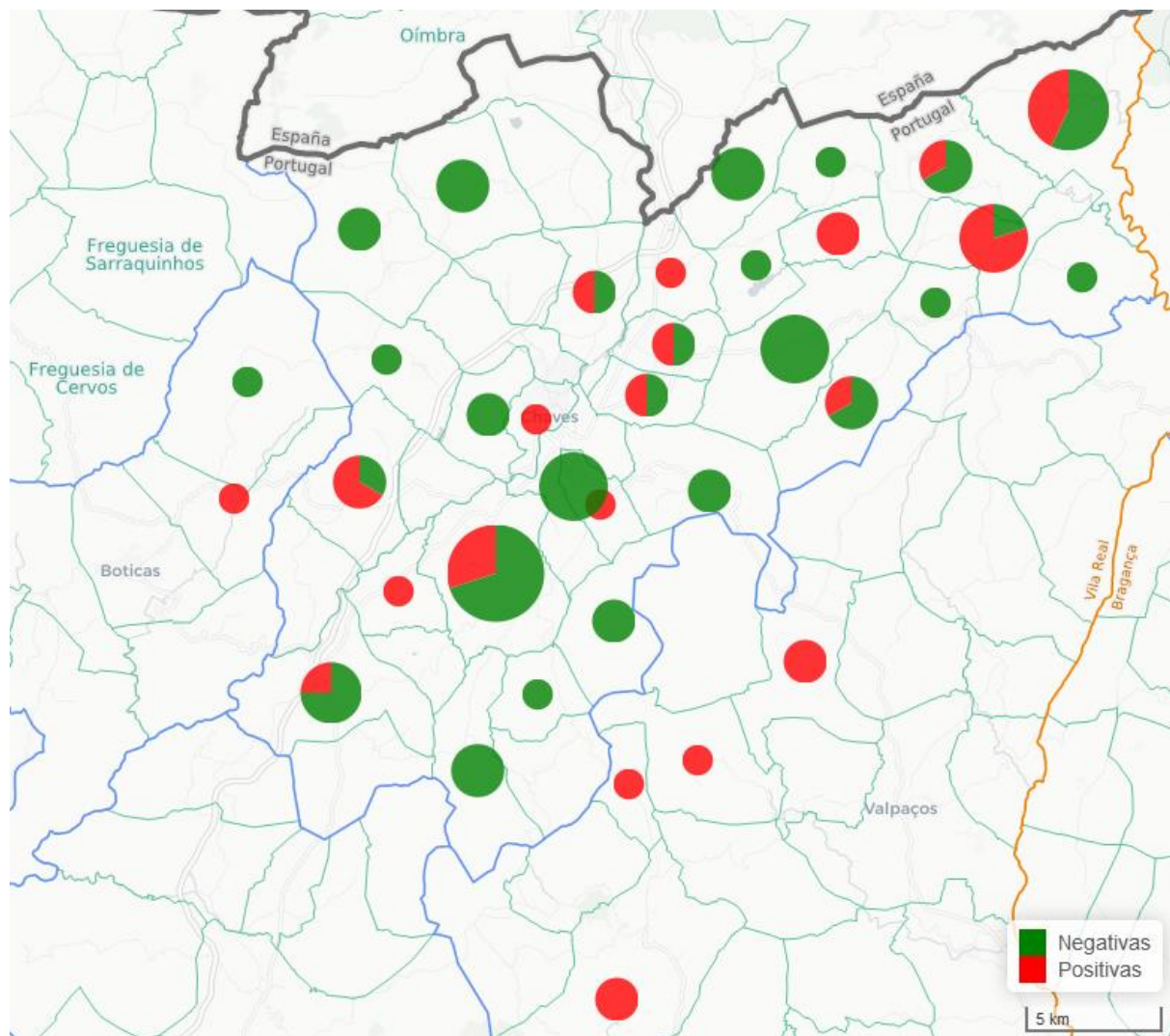


Figura 6. Mapa das freguesias dos concelhos de Chaves, Valpaços e Boticas, ilustrando a percentagem de explorações de pequenos ruminantes visitadas, de cada grupo de classificação positiva ou negativa, em cada freguesia analisada. A dimensão dos gráficos é proporcional ao número total de explorações visitadas na freguesia a que correspondem.

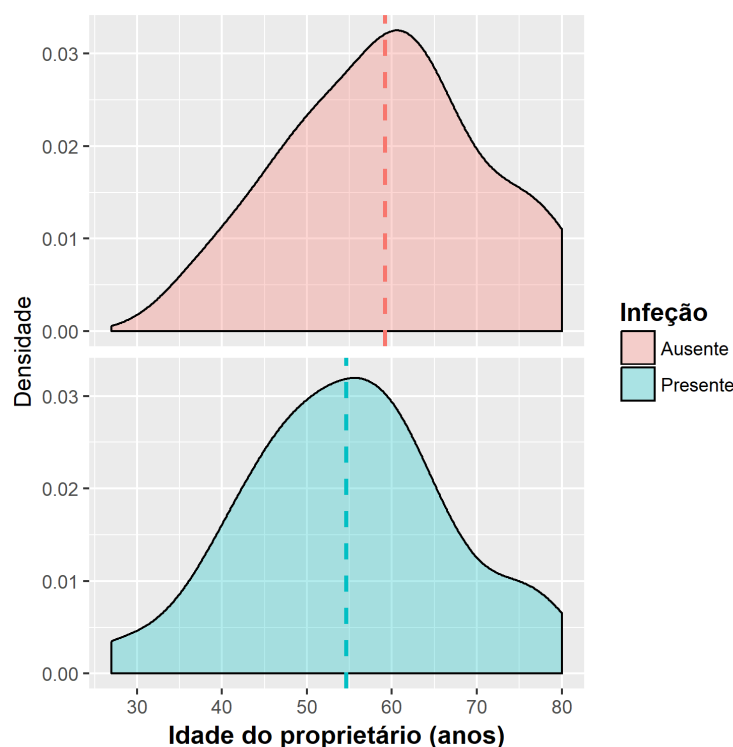


4.2.3. Análise das variáveis demográficas e sanitárias

Através da análise estatística das variáveis quantitativas, respeitantes a dados demográficos e sanitários da amostra de efetivos animais analisados neste estudo (Tabela 8 e Figura 7 a Figura 17), constatou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas em determinadas características dos efetivos, entre os grupos de explorações de classificação positiva e negativa.

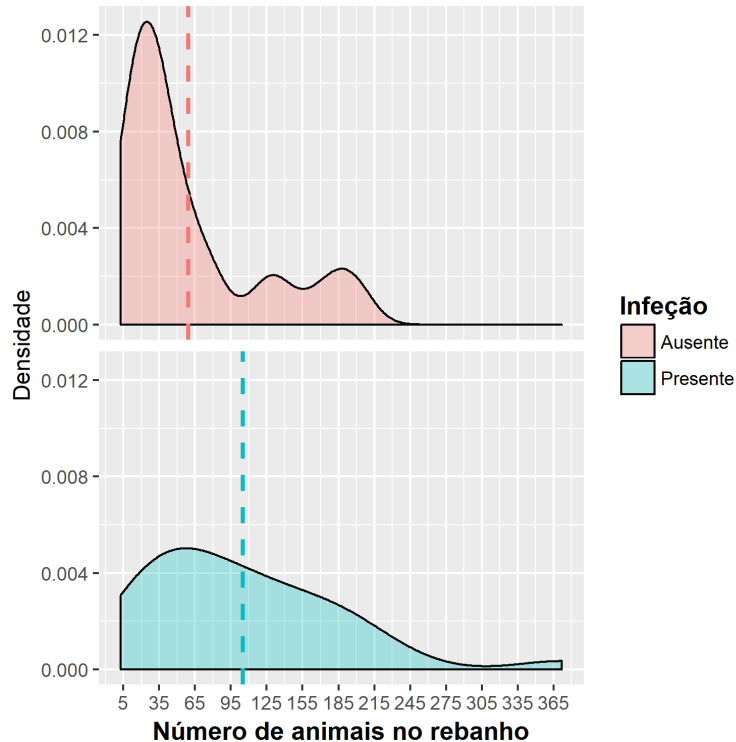
Relativamente à idade dos proprietários da amostra de explorações analisada, não se registaram diferenças significativas entre grupos de explorações de diferente classificação positiva ou negativa (Tabela 8, Figura 7 e Anexo XII).

Figura 7. EDK da idade dos proprietários dos efetivos da amostra, entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.



No que respeita à dimensão dos rebanhos desta amostra, as explorações negativas registaram um maior número de rebanhos de pequena dimensão. Já as explorações positivas apresentaram tanto um número máximo como mínimo de animais por rebanho superior ao grupo das explorações negativas (Tabela 8 e Figura 8). Neste estudo, verificou-se que havia uma relação estatisticamente significativa entre a dimensão dos rebanhos e a ocorrência de BPR, sendo a dimensão dos rebanhos positivos superior à dos negativos (Anexo XII).

Figura 8. EDK da dimensão dos rebanhos da amostra de explorações, entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.



Adicionalmente, confirmou-se que a dimensão dos rebanhos da amostra apresentava relações estatisticamente significativas com a venda de animais nos 12 meses anteriores ao IE, com a presença de cães na exploração e com o contacto próximo entre estas duas espécies. A dimensão dos rebanhos era superior nas explorações que tinham vendido animais nos 12 meses anteriores ao IE, nas explorações onde existiam cães e nas explorações onde havia contacto próximo entre o rebanho e os cães da exploração (Anexo XII).

As explorações visitadas eram, na sua maioria, constituídas por uma reduzida percentagem de animais de reposição (e, por conseguinte, uma grande percentagem de animais adultos) e por uma grande percentagem de ovinos de aptidão produtiva de carne (Tabela 8 e Figura 9).

No grupo de explorações positivas não existiam ovinos de aptidão produtiva leiteira (Tabela 8).

Cada efetivo era composto por uma esmagadora maioria de fêmeas, com um número de machos extremamente reduzido (à exceção de um número diminuto de explorações), não se verificando diferenças significativas entre grupos de diferente classificação de BPR do estudo (Anexo XII). Em 6 explorações da amostra, não se encontravam registados machos no efetivo (Tabela 8 e Figura 10).

Figura 9. EDK da percentagem de animais de reposição no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.

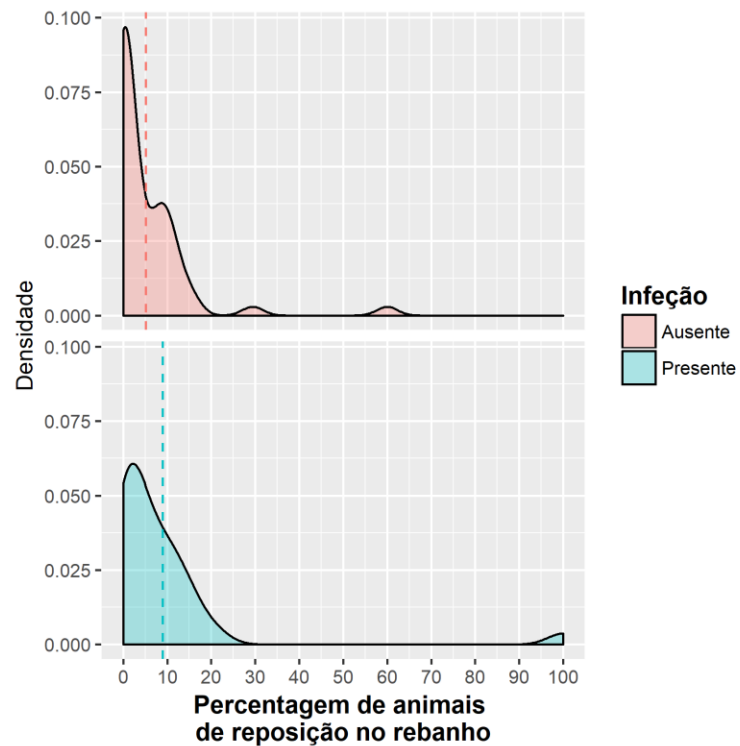
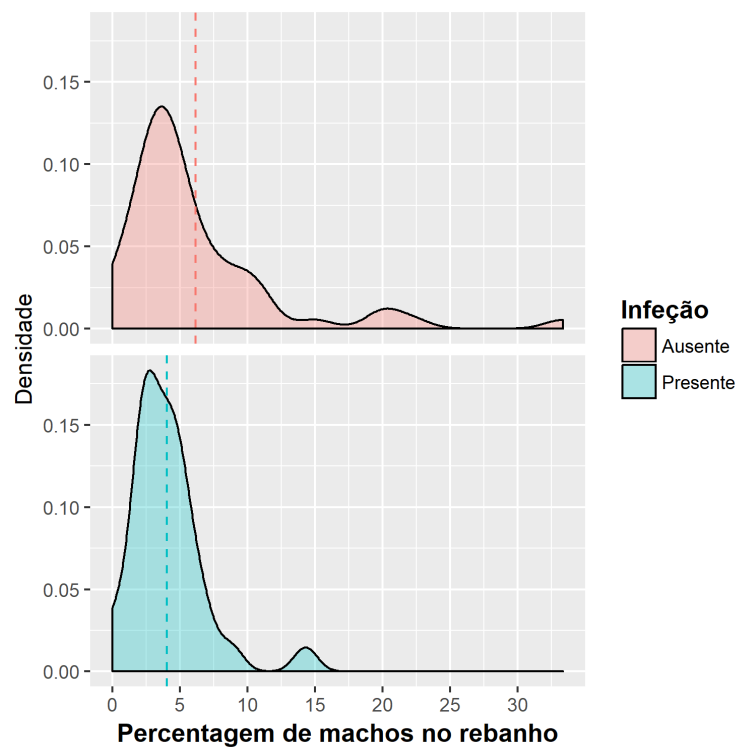
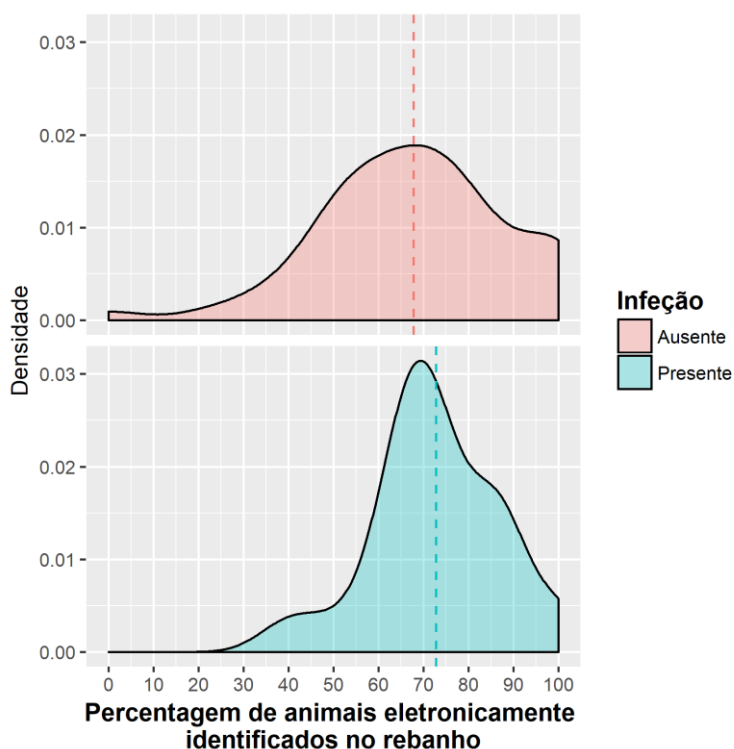


Figura 10. EDK da percentagem de machos no efetivo, entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.



Quanto à percentagem de animais identificados eletronicamente no efetivo, não se observaram, nesta amostra, diferenças significativas entre grupos de explorações classificadas como positivas e negativas, sendo a média próxima dos 70% em ambos os grupos (Tabela 8, Figura 11 e Anexo XII).

Figura 11. EDK da percentagem de animais identificados eletronicamente no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.



Ainda no que concerne a identificação eletrónica dos pequenos ruminantes da amostra, verificou-se que um número considerável de animais não se encontrava abrangido por este tipo de identificação, quando deveria estar, de acordo com o disposto no Decreto-Lei nº 142/2006 (Figura 12, Tabela 7 e Tabela 9). Estes animais tinham idade superior a 9 meses e inferior ou igual a 60 meses (à data da colheita dos dados), o que correspondia aos animais nascidos após 31 de dezembro de 2009. A idade mínima deste conjunto de animais foi de 29 meses (Figura 12 e Tabela 9). Em comparação com este conjunto de animais, constatou-se que um número ligeiramente superior de indivíduos adultos se encontrava identificado eletronicamente, apesar de não carenciar deste tipo de identificação, por terem data de nascimento anterior à indicada (Tabela 7).

Figura 12. EDK da idade (meses) dos animais da amostra não identificados eletronicamente (eID); a média é representada a tracejado; a área vermelha representa a percentagem de animais não eID que o deveriam ser.

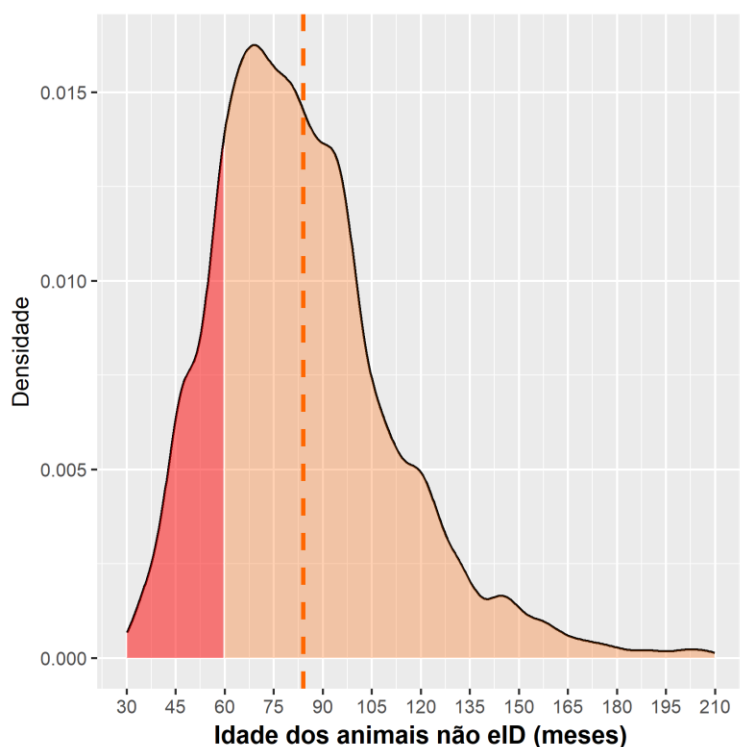


Tabela 7. Descrição quantitativa das intervenções de vacinação (com a vacina Rev.1) e de identificação eletrónica aplicadas de forma devida ou indevida aos pequenos ruminantes da amostra estudada.

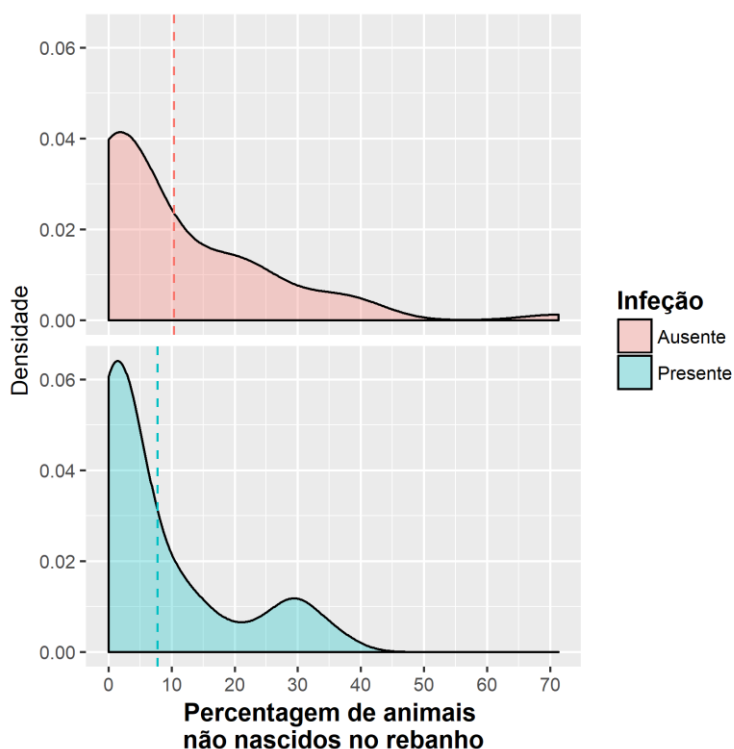
	Número	%
Número total de animais da amostra	7521	100
Vacinação		
Número total de animais 3 ≤ IM ≤ 6 vacinados	3449	45,86
Número total de animais IM < 3 ou IM > 6 vacinados	3*	0,04*
Número total de animais IM > 6 não vacinados	4066	54,06
Identificação eletrónica		
Número total de animais IM ≤ 60 identificados eletronicamente	4461	59,31
Número total de animais IM > 60 identificados eletronicamente	555	7,38
Número total de animais IM > 60 não identificados eletronicamente	2017	26,82
Número total de animais IM ≤ 60 não identificados eletronicamente	488	6,49

Notas: IM – idade dos animais em meses; * outliers excluídos.

No que respeita à percentagem de animais introduzidos no rebanho por compra a outra exploração, verificou-se que não existiam diferenças significativas entre grupos de explorações

classificadas como positivas e negativas, nesta amostra. É de notar, contudo, que o valor máximo foi obtido no grupo das explorações negativas (Tabela 8, Figura 13 e Anexo XII).

Figura 13. EDK da percentagem de animais introduzidos no efetivo (amostra) por compra, entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.



Considerando a totalidade da amostra de animais estudada, constatou-se que apenas 3 indivíduos registaram uma idade no momento da aplicação da vacina Rev.1 fora do período indicado (DGAV, 2018), por apresentarem mais de 6 meses de idade (Tabela 7 e Figura 14). Por outro lado, verificou-se que a maioria dos indivíduos não se encontrava vacinada com a vacina Rev.1, quando deveria estar, por apresentar idade superior a 6 meses (Tabela 7). A percentagem de animais vacinados no efetivo foi máxima no grupo das explorações negativas (Tabela 8). No grupo das explorações positivas, verificamos que a densidade mais elevada de valores desta percentagem se situa abaixo dos 70%, ainda que esta fosse superior à do grupo de explorações negativas (Figura 15). Em ambos os grupos, a média da percentagem de animais vacinados foi inferior a 70% (Tabela 8 e Figura 15). Na amostra estudada, apenas 5 explorações apresentavam uma percentagem de animais vacinados superior ou igual a 70%. Relativamente à idade (em meses) deste conjunto de animais não vacinados da amostra, verificou-se a existência de uma distribuição bimodal com uma densidade acentuada nos 27,5 e 65 meses, aproximadamente (Tabela 9 e Figura 16).

Ainda no que diz respeito à data de nascimento dos animais da amostra, observou-se que houve um aumento marcado do número de animais vacinados, no grupo das explorações com mais de 50 animais, de 2009 para 2010. O número máximo de animais vacinados, em ambos os grupos de efetivos de diferentes dimensões, correspondeu aos animais nascidos em 2013. Porém, a maior proporção de animais vacinados, novamente em ambos os grupos em questão, corresponde aos animais nascidos em 2014 (Figura 17).

Figura 14. Histograma da distribuição das idades declaradas dos animais (grupo de animais vacinados da amostra), em classes de meses, no momento da administração da vacina Rev.1; a média é representada a tracejado.

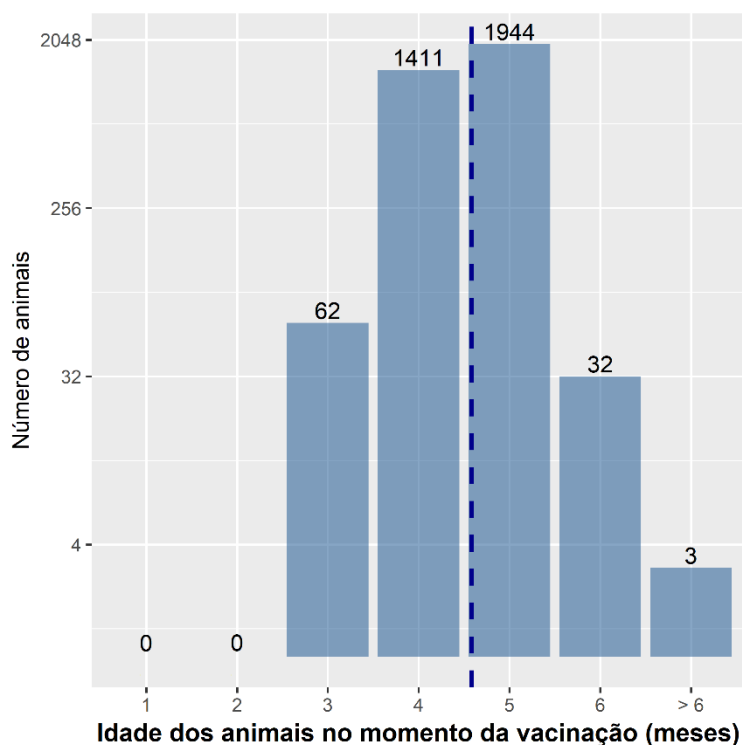


Figura 15. EDK da percentagem de animais vacinados no efetivo (amostra), entre os grupos de classificação positiva e negativa; a média de cada grupo é representada a tracejado.

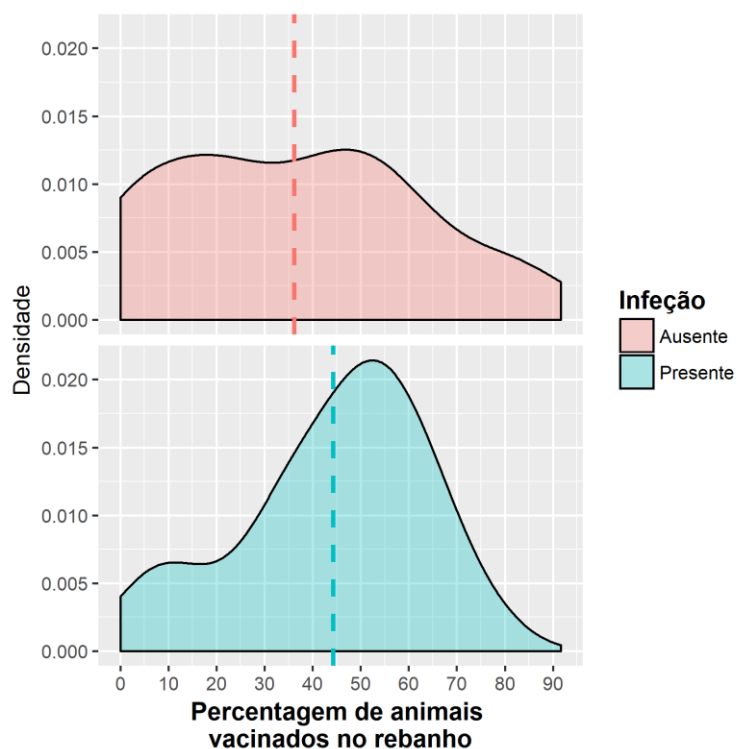


Figura 16. EDK da idade (meses) dos animais não vacinados (amostra); a média é representada a tracejado.

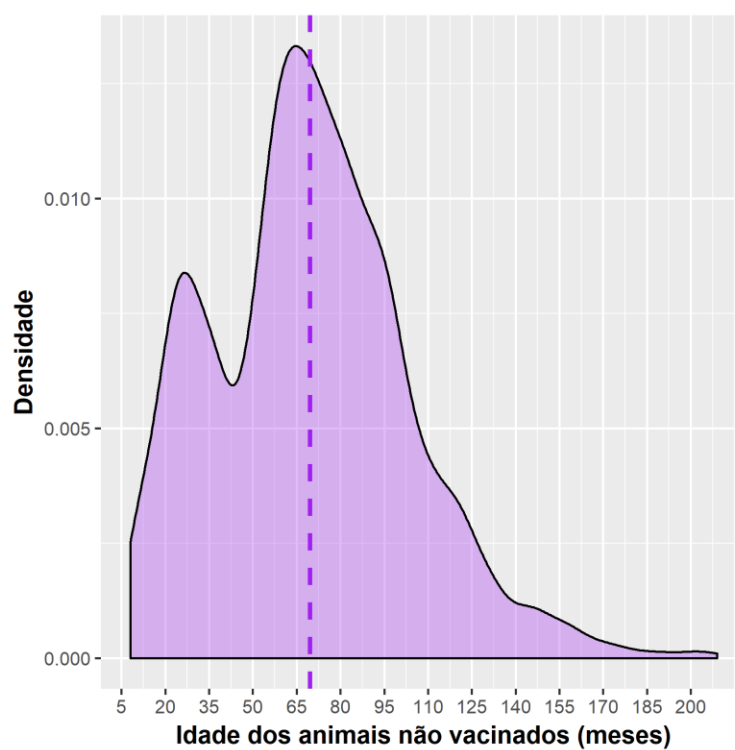


Figura 17. Histograma do número de animais (amostra) por ano de nascimento, entre os grupos de diferente estatuto vacinal. É apresentada a comparação entre o conjunto de rebanhos com mais de 50 animais e o conjunto de rebanhos com um número máximo de 50 animais. A média de cada grupo é representada a tracejado.

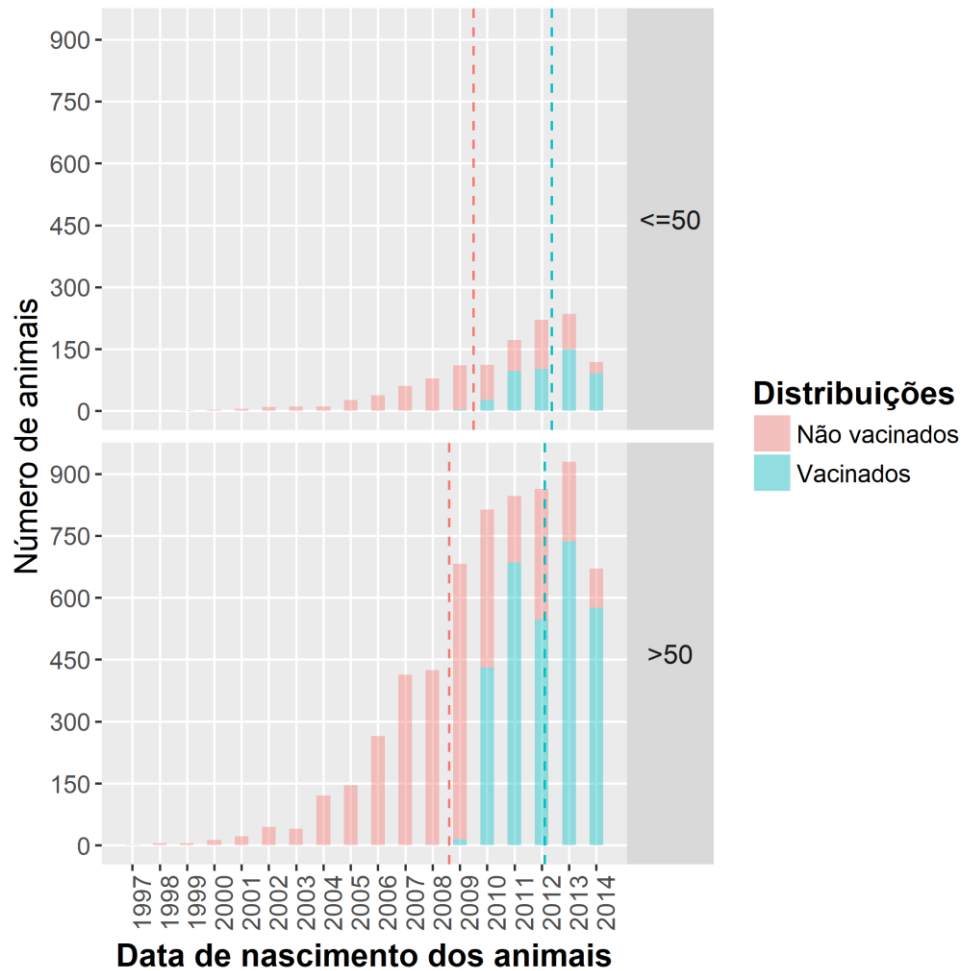


Tabela 8. Descrição estatística das variáveis quantitativas, demográficas e sanitárias, agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

Variáveis	Média ± σ	1º Q*	Mediana	3º Q*	Mín.: Máx.
Idade do proprietário					
Negativas	59,19 ± 11,57	50	60	66	35 : 80
Positivas	54,61 ± 12,01	47	55	61,50	27 : 77
Tamanho do rebanho^A					
Negativas	59,33 ± 58,58	20	34	75	3 : 201
Positivas	104,90 ± 81,13	44	88	153	4 : 372
% de animais de reposição					
Negativas	5,13 ± 9,38	0	0,83	8	0 : 60
Positivas	8,96 ± 17,88	0,31	4,23	10,65	0 : 100

Tabela 8 (continuação)

Variáveis	Média ± σ	1º Q*	Mediana	3º Q*	Mín.: Máx.
% de machos no efetivo					
Negativas	6,13 ± 5,99	2,99	4,48	7,41	0 : 33,33
Positivas	4,02 ± 2,74	2,40	3,73	5	0 : 14,29
% de animais eID** no efetivo					
Negativas	67,81 ± 20,92	54,72	67,39	80,43	0 : 100
Positivas	72,80 ± 14,03	66,08	71,72	83,98	38,14 : 100
% de animais comprados					
Negativas	10,40 ± 14,25	0	4,66	19,01	0 : 71,32
Positivas	7,76 ± 10,73	0	3,23	11,24	0 : 35,71
% de animais vacinados					
Negativas	36,23 ± 25,79	16,07	37,27	54,03	0 : 91,67
Positivas	44,32 ± 19,25	34	48,04	58,32	4 : 77,56
% de ovinos de carne no efetivo					
Negativas	74,12 ± 42,24	50	100	100	0 : 100
Positivas	90,81 ± 25,81	96,82	100	100	0 : 100
% de ovinos de leite no efetivo					
Negativas	0,16 ± 1,20	0	0	0	0 : 9,09
Positivas	0	0	0	0	0
% de caprinos no efetivo					
Negativas	25,72 ± 42,32	0	0	50	0 : 100
Positivas	9,19 ± 25,81	0	0	3,18	0 : 100

Notas: σ – desvio-padrão; * Quartis; ** Identificados eletronicamente; A - associação estatisticamente significativa com a ocorrência de BPR.

Tabela 9. Descrição estatística das variáveis quantitativas, demográficas e sanitárias, ao nível do animal

Variáveis	Média ± σ	1º Q*	Mediana	3º Q*	Mín.: Máx.
Idade (meses) dos animais não vacinados	69,68 ± 33,97	46	68	91	8 : 209
Idade (meses) dos animais não eID	84,05 ± 27,65	65	80	97	29 : 209

4.2.4. Análise dos fatores de risco identificados no inquérito epidemiológico

4.2.4.1. A exploração pecuária

Os dados recolhidos em IE aos proprietários das explorações estudadas foram analisados no sentido de identificar fatores de risco associados à ocorrência de brucelose dos pequenos ruminantes nos efetivos. As respostas às questões do IE foram agrupadas, de acordo com a

sua natureza, em variáveis de caracterização da exploração, de caracterização do efetivo animal, de caracterização do manejo da exploração e variáveis de caracterização do proprietário; a cada resposta é apresentado o número e percentagem de explorações de cada grupo de classificação de BPR do estudo que fornecem essa mesma resposta (Tabela 10 a Tabela 13).

Através da análise dos resultados dos IE, verificamos que a grande maioria das explorações visitadas se localizava no concelho de Chaves (80 explorações numa amostra de 88 explorações visitadas), uma vez que a área de ação da OPP local incidia sobretudo neste concelho (Tabela 10). De igual forma, a maioria das explorações encontrava-se adstrita a uma só propriedade, sendo que nas que se encontravam distribuídas por mais que uma propriedade ocorria, em todos os casos, transferências de animais entre as mesmas (Tabela 10).

Tal como é típico da região transmontana, verificou-se que a aptidão produtiva dos efetivos analisados era quase exclusivamente a produção de carne, com a exceção de uma única exploração, na qual existiam também animais de produção leiteira (Tabela 10).

Quanto à compra de animais de substituição, observou-se pouca disparidade entre os grupos de classificação positiva e negativa do estudo, uma vez que houve, no período analisado, uma aquisição percentual de animais oriundos de outros efetivos relativamente semelhante entre estes (Tabela 10). Na venda de animais do efetivo, num período de 12 meses anterior ao IE, por parte do proprietário, a mesma semelhança não se verificava, embora entre grupos de classificação de BPR distinta a maioria das explorações procedesse a este tipo de transação (Tabela 10). A venda de animais do efetivo foi uma prática que se observou em maior proporção no grupo das explorações positivas (Tabela 10).

O destino dos animais vendidos era variado, contudo a grande maioria das explorações da amostra vendia exclusivamente a particulares (familiares, amigos ou conhecidos, a quem vendiam diretamente) para consumo (Tabela 10).

Verificou-se que, à exceção de uma única exploração negativa, todos os efetivos estudados se alimentavam de pastagem e que a partilha de pastagens entre rebanhos distintos é habitual, estando as explorações negativas mais protegidas deste tipo de contacto indireto, bem como do contacto direto com espécies silváticas (Tabela 10).

Quanto ao contacto dos efetivos com cães, observou-se que este era extremamente comum, sendo que apenas 6 das 88 explorações não tinham cães (Tabela 10). Existindo cães na exploração, o contacto destes com o rebanho era geralmente próximo, sobretudo no grupo de explorações positivas (Tabela 10).

Relativamente à produção e venda de queijo, confirmou-se que apenas a exploração negativa que mantinha animais leiteiros no seu efetivo procedia a esta prática, apesar de outros produtores, ainda que em reduzido número, também ordenharem os seus animais (Tabela 10).

Por outro lado, a venda de cordeiros e/ou cabritos era comum em ambos os grupos de classificação de BPR do estudo (Tabela 10).

Em algumas explorações da amostra foram registadas irregularidades sanitárias, referidas anteriormente, sendo que estas foram observadas em mais de um terço das explorações positivas, em contraste com o grupo das explorações negativas, onde ocorreram com menor frequência (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados das questões de caracterização da exploração, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

Variáveis de caracterização da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Concelho da exploração				
Boticas	1	1,75	1	3,23
Chaves	56	98,25	24	77,42
Valpaços	0	–	6	19,35
Outras propriedades registadas pelo mesmo proprietário				
Não	50	87,72	31	100
Sim	7	12,28	0	–
Transferência de animais entre as suas explorações				
Não	50	87,72	31	100
Sim	7	12,28	0	–
Aptidão produtiva do efetivo				
Carne	56	98,25	31	100
Mista	1	1,75	0	–
Compra de animais de substituição nos últimos 12 meses				
Não	40	70,18	23	74,19
Sim	17	29,82	8	25,81

Tabela 10 (continuação)

Variáveis de caracterização da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Venda de animais vivos nos últimos 12 meses^A				
Não	19	33,33	3	9,68
Sim	38	66,67	28	90,32
Destino dos animais vendidos				
Consumidor	24	42,11	12	38,71
Consumidor e outras explorações	2	3,51	2	6,45
Consumidor, outras explorações e mercado	0	–	1	3,23
Consumidor, outras explorações e negociante	1	1,75	1	3,23
Consumidor, mercado e negociante	0	–	2	6,45
Consumidor e negociante	3	5,26	9	29,03
Outras explorações	8	14,04	2	6,45
Outras explorações e mercado	1	1,75	0	–
Outras explorações e negociante	2	3,51	0	–
Consumo próprio	7	12,28	1	3,23
Matadouro	5	8,77	0	–
Negociante	3	5,26	1	3,23
Negociante e mercado	1	1,75	0	–
Dispensador de água e comida não acessível a outros animais				
Não	37	64,91	26	83,87
Sim	20	35,09	5	16,13
Rebanho alimenta-se de pastagem				
Não	1	1,75	0	–
Sim	56	98,25	31	100
Pastagem partilhada com outros rebanhos^A				
Não	31	54,39	8	25,81
Sim	26	45,61	23	74,19

Tabela 10 (continuação)

Variáveis de caracterização da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Contacto direto com ruminantes de outras explorações				
Não	13	22,81	5	16,13
Sim	44	77,19	26	83,87
Tipo de separação das explorações vizinhas				
Cerca simples em redor da exploração	20	35,09	11	35,48
Ausência de separação física	0	–	1	3,23
Paredes do curral	22	38,60	13	41,94
Muro em redor da exploração	15	26,32	6	19,35
Contacto direto com animais silváticos^A				
Não	13	22,81	1	3,23
Sim	44	77,19	30	96,77
Presença de cães na exploração				
Não	4	7,02	2	6,45
Sim	53	92,98	29	93,55
Cães têm contacto próximo com o rebanho^A				
Não	18	31,58	3	9,68
Sim	39	68,42	28	90,32
Contrata o serviço de trabalhadores que não o Médico Veterinário				
Não	51	89,47	25	80,65
Sim	6	10,53	6	19,35
Produção e venda de queijo				
Não	56	98,25	31	100
Sim	1	1,75	0	–
Venda de cordeiros e/ou cabritos				
Não	12	21,05	2	6,45
Sim	45	78,95	29	93,55

Tabela 10 (continuação)

Variáveis de caracterização da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Prática de ordenha na exploração				
Não	51	89,47	29	93,55
Sim	6	10,53	2	6,45
Observação de irregularidades sanitárias na exploração^A				
Não	50	87,72	20	64,52
Sim	7	12,28	11	35,48

Notas: A – associação estatisticamente significativa com a ocorrência de BPR nas explorações da amostra.

4.2.4.2. O efetivo animal

Analisando os resultados dos IE, referentes ao grupo de questões de caracterização do efetivo animal, observamos que os efetivos estudados são, na sua grande maioria, constituídos por ovinos e que, proporcionalmente, as explorações com caprinos na sua constituição se encontravam mais representadas no grupo das explorações positivas (Tabela 11). É importante notar que a contagem de explorações com presença de ovinos e de explorações com presença de caprinos, obtida em IE – em que se observaram os animais presencialmente – (Tabela 11), difere da obtida através dos dados oficiais, recolhidos nas plataformas ao serviço da DGAV (Tabela 6). No que respeita ainda a espécies ruminantes, existiam duas explorações, uma positiva e outra negativa, que mantinham bovinos na exploração (Tabela 11). Para além das espécies ruminantes referidas, era também extremamente comum a presença de outras espécies animais, nas explorações analisadas (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados das questões de caracterização do efetivo animal, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

Variáveis de caracterização do efetivo animal	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Presença de ovinos no efetivo				
Não	8	14,04	0	—
Sim	49	85,96	31	100
Presença de caprinos no efetivo				
Não	34	59,65	14	45,16
Sim	23	40,35	17	54,84
Presença de bovinos no efetivo				
Não	56	98,25	30	96,77
Sim	1	1,75	1	3,23
Presença de outras espécies suscetíveis a BPR na exploração				
Não	2	3,51	1	3,23
Sim	55	96,49	30	96,77

4.2.4.3. O manejo

No grupo de respostas dos IE referentes à caracterização do manejo da exploração, verificou-se que, em ambos os grupos de explorações (negativas e positivas), a percentagem de explorações cujos proprietários referiam manter os seus animais vacinados com a vacina Rev.1 é superior a 90% ($n = 80/88$), o que é desejável (Tabela 12). De igual modo, também é importante que o proprietário da exploração saiba reconhecer casos de brucelose clínica, quando estes ocorrem nos seus animais, o que se confirmou na maioria das explorações negativas e positivas (Tabela 12).

Por outro lado, verificou-se que apenas numa exploração negativa à BPR, de entre todas as explorações analisadas, se procedia ao isolamento dos animais declarados infetados (Tabela 12). A segurança higio-sanitária das explorações e práticas associadas são insuficientes em quase todas as explorações da amostra estudada (Tabela 12).

Outras práticas de risco para a transmissão de BPR entre ruminantes e entre ruminantes e humanos foram igualmente observadas: em 9 explorações negativas procedia-se à troca de animais reprodutores com outros efetivos; a assistência ao parto, por parte do proprietário, era

frequente entre explorações de classificação positiva e negativa; pelo contrário, era rara a prática de isolar a fêmea pré-parturiente do rebanho (Tabela 12).

Apesar de ser frequente a deslocação diária dos rebanhos para a pastagem, verificou-se que a prática de transumância não o era, entre as explorações analisadas, ainda que um pequeno número de explorações negativas o fizesse (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados das questões de caracterização do manejo da exploração, dos IE aos proprietários das explorações visitadas; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

Variáveis de caracterização do manejo da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Vacinação do efetivo contra BPR				
Não	7	12,28	1	3,23
Sim	50	87,72	30	96,77
Proprietário reconhece casos positivos no efetivo nos últimos 12 meses^A				
Não	55	96,49	6	19,35
Sim	2	3,51	25	80,65
Isolamento dos animais declarados infetados				
Não	56	98,25	31	100
Sim	1	1,75	0	—
Higiene adequada das camas do curral				
Não	41	71,93	22	70,97
Sim	16	28,07	9	29,03
Correta eliminação de estrume				
Não	57	100	30	96,77
Sim	0	—	1	3,23
Correta desinfecção do curral				
Não	50	87,72	28	90,32
Sim	7	12,28	3	9,68
Correta desratização do curral				
Não	57	100	30	96,77
Sim	0	—	1	3,23

Tabela 12 (continuação)

Variáveis de caracterização do manejo da exploração	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Correta eliminação de produtos biológicos de risco				
Não	57	100	29	93,55
Sim	0	—	2	6,45
Partilha de animais reprodutores com outros rebanhos				
Não	48	84,21	31	100
Por vezes	2	3,51	0	—
Sim	7	12,28	0	—
Assistência ao parto				
Não	8	14,04	3	9,68
Por vezes	26	45,61	13	41,94
Sim	23	40,35	15	48,39
Isolamento adequado da fêmea pré-parturiente				
Não	51	89,47	30	96,77
Sim	6	10,53	1	3,23
Fornece feno aos animais				
Não	5	8,77	2	6,45
Por vezes	3	5,26	0	—
Sim	49	85,96	29	93,55
Compra feno a outras explorações				
Não	32	56,14	23	74,19
Por vezes	12	21,05	4	12,90
Sim	13	22,81	4	12,90
Prática de transumância				
Não	49	85,96	31	100
Sim	8	14,04	0	—

Notas: A – associação estatisticamente significativa com a ocorrência de BPR nas explorações da amostra.

4.2.4.4. O proprietário

No grupo de respostas dos IE referentes à caracterização do proprietário da exploração, verificou-se que os proprietários de explorações negativas tendiam a ser mais velhos (Tabela 13). Em ambos os grupos de classificação de BPR do estudo, a maioria dos proprietários das explorações da amostra, pertencia ao sexo masculino e ocupava-se principalmente da agricultura e pecuária, a nível familiar (Tabela 13).

Os principais produtos de origem animal consumidos pelos proprietários dos rebanhos, com origem nos efetivos próprios, eram os animais jovens dos mesmos – cabritos e/ou cordeiros (Tabela 13).

Quanto ao conhecimento das características da brucelose, constatou-se que os detentores de efetivos de espécies suscetíveis à doença se encontravam mal informados. A situação era gravosa no que concerne o conhecimento das vias de transmissão da doença de animais para humanos, uma vez que apenas 8 dos 88 proprietários inquiridos demonstraram ter conhecimento das práticas de risco para a transmissão da infeção ao Homem. A maior parte dos proprietários referiu não saber reconhecer os sintomas da doença em humanos e a grande maioria dos indivíduos que corretamente os identificaram tinham contraído a doença no passado (Tabela 13) ou referiram ter um familiar ou parente próximo que a tinha contraído (Tabela 13). O grupo das explorações positivas registou a percentagem mais elevada de proprietários com suspeita de historial clínico de doença (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados das questões de caracterização do proprietário da exploração, dos IE realizados aos mesmos; respostas agrupadas por classificação de BPR do presente estudo.

Variáveis de caracterização do proprietário	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Idade do proprietário da exploração				
<= 55 anos	21	36,84	16	51,61
> 55 anos	36	63,16	15	48,39
Sexo do proprietário				
Mulher	15	26,32	8	25,81
Homem	42	73,68	23	74,19

Tabela 13 (continuação)

Variáveis de caracterização do proprietário	Respostas			
	Negativas		Positivas	
	n	%	n	%
Principal ocupação do proprietário				
Empresário	2	3,51	0	—
Operário de construção civil	2	3,51	1	3,23
Agricultura e pecuária (familiar)	49	85,96	28	90,32
Função pública	1	1,75	0	—
Produção pecuária (industrial)	0	—	1	3,23
Padeiro	1	1,75	0	—
Negócio local	2	3,51	0	—
Negociante de gado	0	—	1	3,23
Produtos animais consumidos pelo proprietário				
Cordeiros e/ou cabritos	53	92,98	30	96,77
Cordeiros e/ou cabritos e queijo	1	1,75	0	—
Cordeiros e/ou cabritos e queijo fresco	1	1,75	1	3,23
Cordeiros e/ou cabritos e leite	2	3,51	0	—
Proprietário tem conhecimento das vias de transmissão de BPR ao Homem				
Não	52	91,23	28	90,32
Sim	5	8,77	3	9,68
Proprietário tem conhecimento dos sintomas de brucelose humana				
Não	38	66,67	19	61,29
Sim	19	33,33	12	38,71
Proprietário contraiu brucelose no passado				
Não	46	80,70	20	64,52
Sim	11	19,30	11	35,48

4.2.4.5. Sumário do conjunto de fatores de risco identificados

Tendo em consideração a análise das diferenças ao nível das relações entre as variáveis independentes deste estudo e a classificação positiva ou negativa da exploração, verificámos que 10 variáveis apresentavam associação significativa com a classificação de BPR do presente estudo (Tabela 14).

Na amostra analisada, os rebanhos com mais de 50 animais apresentavam uma probabilidade de se encontrarem infetados cerca de 4,12 vezes mais elevada do que rebanhos com 50 ou menos animais (Tabela 14).

As explorações analisadas, cujos rebanhos tinham na sua constituição ovelhas e cabras, apresentavam uma probabilidade de infeção aproximadamente 3,32 vezes superior à das explorações com rebanhos de uma única espécie (Tabela 14).

Quanto ao reconhecimento da ocorrência de casos de BPR no efetivo por parte do proprietário (nos 12 meses antecedentes ao IE), podemos afirmar que se encontra significativamente associado à ocorrência de infeção nos efetivos da amostra (Tabela 14).

A venda de animais nos 12 meses anteriores ao IE apresentava, entre as explorações desta amostra, uma probabilidade de infeção cerca de 4,6 vezes superior relativamente às explorações que não tinham participado nessa prática (Tabela 14). Por outro lado, verificou-se que a venda de animais no período indicado não apresentava interação com o tamanho do rebanho (Anexo XII).

A partilha de pastagem com outros efetivos apresenta associação estatisticamente significativa com a ocorrência de doença nos efetivos da amostra. Explorações que partilhavam pastagens com outros rebanhos tinham cerca de 3,38 vezes mais probabilidade de apresentar infeção do que as que não o faziam (Tabela 14).

Comprovou-se que o contacto dos efetivos analisados com espécies silváticas apresentava uma associação estatisticamente significativa com a ocorrência de infeção nos mesmos. A probabilidade de infeção no grupo de explorações que reportavam a ocorrência deste tipo de contactos era aproximadamente 8,71 vezes superior à das explorações isoladas destas espécies animais (Tabela 14).

O contacto próximo entre os rebanhos da amostra e cães da própria exploração também demonstrou estar associado à ocorrência de BPR no efetivo (Tabela 14).

As explorações da amostra em que se confirmou a prática de irregularidades sanitárias apresentavam uma probabilidade de se encontrarem infetadas cerca de 3,86 vezes mais elevada do que explorações nas quais estas práticas não foram observadas (Tabela 14).

A associação estatística demonstrou risco inferior (fator de proteção) em relação à identificação de animais eletronicamente e à partilha de reprodutores entre efetivos (Tabela 14). Quanto à partilha de animais reprodutores, nunca foi declarada esta prática pelas explorações positivas.

Tabela 14. Resultados do teste de Fisher e análise do *Odds-ratio* das variáveis demográficas e sanitárias categorizadas e questões dos 88 IE caracterizadoras de risco para a transmissão de BPR.

Variáveis	<i>Odds-ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor de <i>p</i>	Proporção
Tamanho do rebanho	4,118	1,493 : 12,206	0,003	0,710
Presença de ovinos	4,226	0,858 : 41,350	0,074	0,935
Presença de ovinos de leite	0	0 : 71,631	1	0
Presença de caprinos	1,235	0,457 : 3,305	0,654	0,419
Rebanho misto	3,317	1,041 : 11,088	0,029	0,355
% de machos no efetivo	4,831	0,597 : 224,223	0,151	0,968
% de animais de reposição	2,744	0,981 : 8,341	0,042	0,742
% de animais vacinados	3,489	0,394 : 167,536	0,414	0,968
% de animais eID*	0,201	0,035 : 0,780	0,011	0,097
% de animais comprados	1,316	0,482 : 3,750	0,646	0,677
Proprietário reconhece BPR (12 m)**	102,251	19,073 : 1090,219	<0,05	0,806
Isolamento de animais infectados	Inf	0,014 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	0,820	0,263 : 2,397	0,807	0,258
Venda de animais (12 m)**	4,596	1,181 : 26,597	0,019	0,903
Partilha de reprodutores	0	0 : 0,858	0,024	0
Isolamento da fêmea (pré-parto)	3,489	0,394 : 167,536	0,414	0,968
Partilha de pastagem	3,379	1,208 : 10,295	0,013	0,742
Contacto com outros efetivos	1,529	0,446 : 6,121	0,584	0,839
Contacto com espécies silváticas	8,708	1,188 : 388,297	0,016	0,968
Cães têm contacto próximo com o rebanho	4,246	1,085 : 24,648	0,034	0,903
Irregularidades sanitárias	3,860	1,175 : 13,592	0,014	0,355

Notas: Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

4.2.4.6. Análise multivariada – regressão logística

O modelo explicativo selecionado para este estudo foi o de regressão logística por eliminação regressiva (Tabela 15 e Anexo VIII).

Este modelo permitiu estimar a probabilidade de infecção por BPR num rebanho, dado um conjunto de características: tamanho do rebanho, partilha de pastagem com outros rebanhos, contacto do mesmo com espécies silváticas e a prática de irregularidades sanitárias na exploração.

Segundo este modelo, existia uma forte associação ($p < 0,05$) entre o tamanho do rebanho e a prática de irregularidades sanitárias na exploração com a ocorrência de BPR no efetivo (Tabela 15). Considerando que as restantes variáveis se mantinham iguais, rebanhos com mais de 50 animais apresentavam uma probabilidade de se encontrarem infetados cerca de 3,59 vezes superior à de rebanhos com 50 ou menos animais. Da mesma forma, assumindo que não ocorriam variações nas restantes variáveis, verificou-se que explorações nas quais se observou a prática de irregularidades sanitárias tinham cerca de 4,2 vezes maior probabilidade de apresentar infecção do que as explorações nas quais estas práticas não foram observadas (Tabela 15).

Tabela 15. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo resultante da estratégia de redução por eliminação regressiva, aplicada ao modelo global.

Variáveis	Parâmetros de regressão logística			
	β	SE	Valor de Z	Valor de p
(Ordenada na origem)	-3.647	1.171	-3.115	0.002
Tamanho do rebanho	1.277	0.534	2.394	0.017
Partilha de pastagem	0.894	0.550	1.626	0.104
Contacto com espécies silváticas	1.636	1.168	1.401	0.161
Irregularidades sanitárias	1.434	0.637	2.254	0.024

Notas: β – estimativa; SE – erro-padrão; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Capítulo 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1. Avaliação das atividades de saneamento

Confirmou-se, no presente estudo, o papel fulcral do médico-veterinário na execução das atividades de saneamento. Apenas esta classe de profissionais reúne os conhecimentos técnicos e científicos para a correta execução do PEBPR, daí que esteja previsto no mesmo a sua participação nas intervenções sanitárias e esteja reservada a esta classe profissional a execução de certas práticas, tais como a aplicação da vacina Rev.1.

Será importante avaliar, no futuro, a associação entre o adequado acompanhamento médico-veterinário das explorações desta região e a ocorrência de infeção por *B. melitensis* em rebanhos, pois foi verificada a sua importância noutros estudos (Lithg-Pereira, Rojo-Vázquez, & Mainar-Jaime, 2004). Um adequado acompanhamento médico-veterinário das explorações será, naturalmente, um fator importante, na medida em que poderá proporcionar a correção de uma série de práticas que favorecem a ocorrência de BPR e sua transmissão entre rebanhos, animais e pessoas.

Sugere-se então que o conjunto das OPP tenham o mesmo nível de exigência ou que a sua responsabilidade seja de base geográfica. Da mesma forma, deverão atuar os serviços médico-veterinários oficiais (DGAV), perante a confirmação destas ocorrências, uma vez que, por sua vez, supervisionam as atividades das OPP.

5.1.1. Práticas de biossegurança

A importância da intervenção direta do médico veterinário revelou-se no decorrer do acompanhamento das intervenções de saneamento da OPP pela falta de medidas de biossegurança praticadas pelos técnicos da mesma organização, proprietários dos rebanhos e familiares e/ou amigos que os auxiliavam. Estes intervenientes encontravam-se com frequência em risco de contração de infeção, bem como os seus rebanhos, devido às múltiplas práticas de risco, levadas a cabo no decorrer das intervenções sanitárias e anteriormente referidas.

O papel do médico veterinário perante este tipo de situações deverá ser o de educar os intervenientes quanto às práticas de risco para a transmissão de infeção e garantir que este risco seja reduzido ao máximo pelo seguimento das medidas de biossegurança descritas no PEBPR.

Por forma a minimizar o risco de transmissão de agentes infecciosos entre explorações é aconselhável aplicar medidas de biossegurança à entrada e saída das mesmas e a utilização

de equipamento de proteção pessoal descartável. Idealmente, seria feita a desinfecção dos veículos e utilizar-se-iam, sempre que possível, rodilúvios e pedilúvios na entrada e saída das explorações. Estas práticas não se verificaram, pelo que os veículos e equipamentos de proteção pessoal utilizados podem contribuir para a transmissão de infeção entre explorações.

O desconhecimento dos indivíduos envolvidos nas intervenções sanitárias, relativamente a que medidas de biossegurança tomar, era agravado pela inexistência de meios para garantir a execução destas medidas.

Na impossibilidade de utilização de rodilúvios, a desinfecção dos veículos utilizados deveria ser regular e estes não se deveriam deslocar ao interior das explorações. Perante a inexistência de pedilúvios para desinfecção das botas, estas deveriam ser lavadas e desinfetadas sistematicamente entre explorações ou, sobre estas, aplicado material descartável. Os técnicos e médicos veterinários que se deslocassem às explorações deveriam utilizar equipamento de proteção pessoal completo e descartável.

Por outro lado, os proprietários também deveriam ser educados para as práticas de biossegurança que lhes competem, na medida em que se verificou noutros estudos a importância de limpezas e desinfecções regulares na prevenção da BPR, provavelmente pela suscetibilidade de *B. melitensis* à maioria dos produtos desinfetantes (Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999; Reviriego, Moreno, & Domínguez, 2000; Coelho et al., 2007). O médico veterinário deveria igualmente explicar aos proprietários de rebanhos a importância de não consumirem ou venderem produtos lácteos não pasteurizados dos seus animais – uma vez que podem, desta forma, contribuir para a transmissão de brucelose a humanos – e quais os sintomas da brucelose em humanos, que os devem levar a consultar o médico, uma vez que a grande maioria referiu desconhecer-los.

5.1.2. Vacinação

No que respeita à vacinação dos efetivos, verificou-se que ainda existe margem para obter melhores resultados no que concerne os objetivos da vacinação previstos no PEBPR. Por forma a obter efeito populacional e evitar a persistência de BPR seria desejável obter, por efetivo, uma cobertura vacinal superior ou igual a 70%, pois esse valor já cobre uma proporção considerável de animais em cada exploração. Contudo, esses valores só se verificaram numa minoria de explorações ($n = 7$; 7,95%), ainda que a maioria ($n = 80$; 90,91%) das explorações da amostra vacinasse os seus animais.

Tendo em conta as medidas aplicadas no passado, nomeadamente com a vacinação massal iniciada a 2001, com posterior vacinação apenas de indivíduos jovens a partir de 2005 e sabendo que na amostra em análise não existiam rebanhos em regime especial sem vacinação,

seria de esperar uma cobertura vacinal superior à verificada. Seria compreensível a existência de um número pequeno de animais com idade superior a 6 meses não vacinados, dado o elevado número de explorações a cargo da OPP local e a reduzida janela temporal para aplicação da vacina Rev.1, quando considerada a necessidade de calendarização das intervenções sanitárias. Todavia, o número de animais não vacinados da amostra foi bastante elevado ($n = 4066$; 54,06%).

O facto de se ter verificado que as explorações da amostra não praticavam sazonalidade de partos provocava a sua dispersão temporal, o que obrigaria a múltiplas visitas à mesma exploração para vacinar todos os indivíduos jovens no período correto (entre os 3 e os 6 meses de idade). Uma vez que a OPP não tinha meios para dar resposta a essa necessidade, verificava-se que muitas vezes os animais eram vacinados fora do período recomendado (com mais de 6 meses de idade) e a sua idade falseada. Por este motivo, os resultados da análise da idade dos animais no momento da vacinação não são fidedignos e garantidamente que um número muito superior de animais terá sido vacinado com mais de 6 meses de idade.

A distribuição bimodal da idade dos animais não vacinados, com uma redução marcada do número de animais não vacinados com cerca de 42,5 meses de idade à data (nascidos no verão de 2011), indica bons resultados da campanha de vacinação que decorreu no final do ano 2011 e início de 2012. A redução acentuada verificada após a moda mais elevada resulta da sobrevivência de um reduzido número de animais mais velhos, sem utilidade produtiva.

Da análise da data de nascimento dos animais conclui-se que os animais mais velhos mantidos nas explorações da amostra foram os não vacinados. O aumento abrupto da proporção de animais vacinados de 2009 para 2010 e progressivamente daí em diante, poderá sugerir uma maior eficácia do plano de vacinação a partir de 2009.

De um modo geral, as explorações com rebanhos de maior dimensão refugam os animais por volta dos 7 anos de idade, pelo que seria de esperar que a maioria dos animais nascidos em 2007 ou antes pertencessem ao grupo de explorações de menor dimensão, o que não se verificou.

5.1.3. Identificação eletrónica

A importância da avaliação dos dados relativos à identificação eletrónica dos animais da amostra reside no facto de estes permitirem indicar a eficácia do cumprimento, por parte da OPP, dos preceitos legais relativos à identificação animal e, de forma abrangente, das suas obrigações enquanto entidade reguladora da sanidade animal. A identificação dos animais é considerada indispensável para o correto saneamento da população.

Um número considerável de animais da amostra ($n = 488$; 6,49%) não se encontrava identificado eletronicamente quando deveria legalmente estar, por serem animais com mais de 9 meses nascidos após 31 de dezembro de 2009 (Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de julho de 2006). A OPP local deveria ter garantido a sua identificação eletrónica, ainda que se tenha verificado que alguns proprietários recusavam este tipo de identificação nos seus animais. Contudo, todos os animais nascidos e identificados no período dos 2 anos e meio (30 meses) anteriores à colheita dos dados foram identificados eletronicamente, indicando uma correta aplicação das normas de identificação animal nesse período. O aumento gradual do número de animais não identificados eletronicamente anteriormente a esta data poderá ter correspondido ao período de adaptação a esta medida. A diminuição progressiva do número de animais não identificados eletronicamente a partir de cerca de 1 ano antes do início da obrigatoriedade deste tipo de identificação – quando se registou o número máximo de animais sem esta identificação – poderá ter resultado do refugo dos animais mais velhos.

A importância deste tipo de identificação reside no facto de permitir colmatar limitações da identificação exclusiva por marca auricular. De entre estas limitações destacam-se as trocas de brincos entre animais e remoção dos mesmos, com vista a transações não regulamentadas e a perda ou extravio de brincos, o que poderá provocar a perda do historial sanitário do animal. A relutância na aplicação do bolus ruminal deve-se à sua grande dimensão, podendo provocar lesões no esófago e até morte de animais de pequeno porte, quando identificados entre os 3 e os 6 meses, aquando da vacinação contra a brucelose.

5.1.4. Registos de existências

Observou-se que um grande número de animais não era identificado por qualquer meio de identificação, não sendo feito o registo da sua existência na exploração. A maioria destes animais era jovem, razão pela qual os efetivos da amostra eram constituídos quase na totalidade por adultos, segundo a análise dos registos existentes. Esta prática poderá dever-se à maior facilidade com que os proprietários poderiam proceder a transações não declaradas entre si, ou ao abate e venda ou mesmo consumo indiscriminado destes animais.

Por outro lado, confirmou-se que num reduzido número de explorações ($n = 6$) não existia registo da presença de machos no efetivo. Sabendo que todos os proprietários da amostra analisada indicaram não recorrer a técnicas reprodutivas (como inseminação artificial ou transferência de embriões), surgem 2 hipóteses que permitem explicar a manutenção do efetivo e reposição dos animais do mesmo: os proprietários recorriam à troca de machos reprodutores com outras explorações – o que se confirmou numa dessas explorações – ou existiam animais não declarados no efetivo. Ambas as hipóteses favorecem o risco de transmissão de BPR.

A segunda hipótese apresentada é novamente apoiada pelo facto de se ter verificado uma disparidade na contagem de explorações com presença de ovinos e de explorações com presença de caprinos, entre os dados obtidos em IE – em que se observaram os animais presencialmente – e os dados recolhidos nas plataformas ao serviço da DGAV. Verificou-se presencialmente a existência de ovinos em mais 7 explorações e de caprinos em mais 6 explorações do que as que tinham o registo destas espécies no seu efetivo.

5.2. Estudo dos fatores de risco ao nível da exploração

A identificação e quantificação de fatores de risco, associados à ocorrência de BPR nos efetivos de pequenos ruminantes, tem como principal objetivo auxiliar na identificação de um conjunto de medidas que poderá ser alvo preferencial do investimento em recursos humanos e materiais (Martins & Vaz, 2002). Estes fatores de risco poderão variar temporal e geograficamente, estando geralmente associados a práticas de manejo da amostra, pelo que a sua caracterização poderá auxiliar no ajustamento das intervenções do PEBPR em zonas em que a prevalência e incidência da BPR são especialmente elevadas e a erradicação da doença particularmente difícil de alcançar.

Na análise univariada do presente estudo verificou-se a existência de associação significativa ($p < 0,05$) com a classificação positiva de BPR dos efetivos nas variáveis: 'dimensão do rebanho', 'rebanho misto', 'proprietário reconhece casos de brucelose no efetivo nos 12 meses anteriores ao IE', 'venda de animais nos 12 meses anteriores ao IE', 'partilha de pastagem com outros rebanhos', 'contacto do rebanho com espécies silváticas', 'contacto próximo do rebanho com cães' e, por fim, 'observação da prática de irregularidades sanitárias na exploração'.

A ênfase principal na modelagem de dados empíricos é entender a estrutura, o processo ou o sistema biológico em estudo e a interação entre as variáveis (Burnham & Anderson, 2002). É importante notar que, segundo o defendido por Burnham e Anderson (2002), não existe nas ciências biológicas um "modelo verdadeiro", isto é, nenhum dos modelos considerados como base para a análise de dados é o "modelo verdadeiro" que gera os dados biológicos observados. A realidade plena tem uma dimensão essencialmente infinita e, portanto, não pode ser revelada apenas com amostras finitas de dados e um "modelo" desses dados. Um modelo é uma simplificação ou aproximação da realidade e, portanto, não refletirá toda a realidade. Só é possível procurar identificar um modelo que forneça uma boa aproximação aos dados disponíveis.

Assim, procedeu-se a uma análise multivariada dos fatores de risco para a ocorrência de BPR, através de regressão logística múltipla com variável de resposta dicotómica. Na análise multivariada, que contempla a interação entre as diversas variáveis na associação com a

variável dependente, verificou-se a existência de associações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com a classificação de BPR dos efetivos nas variáveis: 'dimensão do rebanho' e 'observação da prática de irregularidades sanitárias na exploração'.

Um dos maiores obstáculos na análise dos fatores de risco encontrado no decorrer do presente estudo – e na análise de dados em geral – dizia respeito à qualidade dos dados obtidos. Se por um lado era frequente verificar que os dados extraídos das bases de dados ao serviço da DGAV se encontravam com frequência incompletos, era também recorrente confirmar que as informações cedidas em IE pelos proprietários dos rebanhos de pequenos ruminantes não correspondiam à verdade. Adicionalmente, será legítimo questionar a veracidade de muitos dos dados constantes nas mesmas bases de dados, tendo em conta a manipulação dos registos que se verificou por parte dos intervenientes responsáveis pela colheita dos dados.

Por outro lado, nas variáveis 'presença de ovinos de leite', 'isolamento de animais infetados' e 'partilha de reprodutores' observou-se a ocorrência de separação perfeita dos dados, que resulta em estimativas infinitamente elevadas ou reduzidas nos testes estatísticos, para essas variáveis – uma vez que estas permitem prever perfeitamente a ocorrência de BPR – de acordo com os dados da amostra, o que geralmente não é legítimo assumir para a população subjacente (Zorn, 2005), dados os problemas de representatividade da amostra.

5.2.1. Dimensão do rebanho

A associação entre a elevada dimensão do rebanho e a ocorrência de BPR tem sido descrita com frequência noutros estudos (Lithg-Pereira, Mainar-Jaime, Álvarez-Sánchez, & Rojo-Vázquez, 2001; Robinson, 2003; Lithg-Pereira et al., 2004; Al-Majali, 2005; Coelho et al., 2007; Coelho, Coelho, Góis, Pinto, & Rodrigues, 2008) e reflete os aspetos epidemiológicos da BPR. Em rebanhos maiores, a probabilidade de transmissão da BPR entre indivíduos e a sua manutenção no rebanho será superior, possivelmente devido à presença de um maior número de animais suscetíveis à infeção (Coelho et al., 2007), à maior densidade de animais em estabulação, que geralmente se verifica (Lithg-Pereira et al., 2001; Al-Majali, 2005), ou a outros fatores, tais como a maior probabilidade de introdução e transmissão do agente no rebanho e entre os animais do rebanho, ou ainda a diferentes práticas de manejo que estes rebanhos possam requerer (Lithg-Pereira et al., 2001; Coelho et al., 2008).

5.2.2. Espécies constituintes do efetivo

No que respeita à constituição do rebanho, constata-se novamente que os resultados do presente estudo se aliam aos de estudos paralelos, nomeadamente no que concerne à maior

probabilidade de infeção em efetivos mistos (Lithg-Pereira et al., 2001, 2004; Megersa et al., 2011). A classificação da presença de mais que uma espécie de pequenos ruminantes no efetivo como fator de risco para a ocorrência de infeção foi estabelecida no passado e pode dever-se à maior suscetibilidade à BPR reconhecida para a espécie caprina (Al-Majali, 2005; Megersa et al., 2011), o que poderá favorecer a manutenção da doença no efetivo.

Porventura, a presença de diferentes raças nos efetivos, com diferentes suscetibilidades à BPR, poderá justificar a identificação deste fator de risco. Possivelmente, tal não será realidade na amostra analisada, sendo mais provável o contributo da maior suscetibilidade da espécie caprina para a significância deste fator (Crespo León, 1994a).

5.2.3. Reconhecimento da ocorrência de casos de BPR no efetivo

Os resultados obtidos relativamente ao reconhecimento da ocorrência de sinais compatíveis com BPR no efetivo, por parte do proprietário (nos 12 meses antecedentes ao IE), podem ser interpretados como uma consequência das intervenções da OPP e DSAVR Norte na sua exploração, em seguimento de um diagnóstico de infeção e reinspecções e associação à ocorrência de abortos e problemas de fertilidade nos animais.

O facto de nem sempre o proprietário revelar um correto reconhecimento da ocorrência de doença pode ter-se devido ao receio de se prejudicar a si mesmo ao revelar a possível presença da doença e, portanto, por incompreensão do propósito do IE, ou ainda do propósito de intervenções sanitárias aplicadas à sua exploração no passado.

Por outro lado, verificou-se que 2 proprietários de rebanhos da amostra referiram ter tido animais com sinais compatíveis com BPR no efetivo nos 12 meses anteriores ao IE, quando não existia registo do mesmo. Possivelmente estes proprietários não terão compreendido a questão colocada ou o motivo de eventuais intervenções da OPP no seu rebanho nesse período. A última hipótese poderá ter sido motivada pela ocorrência de reinspecções às explorações em questão, para realização de novas provas serológicas devido a resultados não negativos.

5.2.4. Venda de animais do efetivo

A associação entre a venda de animais nos 12 meses anteriores ao IE e a ocorrência de infeção, nos efetivos da amostra, pode ter-se devido ao facto desta questão ilustrar, com maior veracidade, a prática de transações de animais entre explorações do que a compra de animais, na medida em que poderá ser entendida pelo proprietário como menos prejudicial para a sua prática.

Por outro lado, verificou-se no presente estudo que a percentagem de animais introduzidos na exploração por compra não apresentou associação com a ocorrência de infeção nos efetivos, ao contrário de resultados obtidos noutros estudos (Lithg-Pereira et al., 2004). Tal dever-se-á certamente ao facto de que as transações contempladas por esta variável terão sido feitas de forma regulamentada (pois existe o seu registo), o que implica que os animais adquiridos fossem oriundos de explorações sem infeção.

Sabendo que as transações de animais entre rebanhos, nomeadamente a introdução de animais no efetivo, favorece a transmissão de infeção (Dalrymple, 1993), é legítimo especular que a significância deste fator poderá representar o encobrimento, por parte dos proprietários dos rebanhos, de transações não regulamentadas, conforme sugerido por Lithg-Pereira et al., (2001, 2004).

A significância desta variável poderá também ser explicada pela sua interação com a dimensão do rebanho, uma vez que a última está igualmente associada à ocorrência de infeção nos efetivos da amostra. Do ponto de vista financeiro e atendendo à gestão dos efetivos, faz sentido que, em explorações com rebanhos de maior dimensão, a venda de animais seja mais frequente. Tendo presente que vários estudos têm reportado a associação da dimensão do rebanho com a ocorrência de BPR (conforme referido anteriormente), a associação da venda de animais com a presença de doença poderá então ser consequência da dimensão do rebanho e não diretamente desta prática, o que do ponto de vista epidemiológico fará mais sentido.

5.2.5. Partilha de pastagens com outros rebanhos

A existência de associação entre a partilha de pastagem e a ocorrência de BPR nos efetivos da amostra vem corroborar o que foi descrito por outros autores, no que diz respeito à importância deste fator na epidemiologia da BPR (Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999; Reviriego et al., 2000; Megersa et al., 2011). O agente é excretado por animais infetados para o meio ambiente, contaminando assim as pastagens, que se tornam fontes de infeção para outros rebanhos (Corbel, 2006). Assim sendo, e sabendo que era comum a partilha de pastagens por parte dos rebanhos da amostra, seria importante, no futuro, averiguar a relação entre a incidência de BPR nos efetivos e a proximidade de rebanhos infetados, na medida em que cada rebanho utilizará as pastagens em redor do seu curral (Lithg-Pereira et al., 2001, 2004).

Por forma a evitar este modo de transmissão de BPR entre rebanhos, uma medida que eventualmente se poderia pôr em prática seria a atribuição de certas parcelas de pastagem, nomeadamente de terrenos baldios, consoante a classificação sanitária oficial dos efetivos. Contudo, o sucesso desta medida dependeria da completa colaboração por parte dos proprietários dos efetivos de pequenos ruminantes, pois o controlo do cumprimento da mesma

não é exequível. Uma alternativa a esta medida, sugerida por Reviriego et al. (2000), seria a proibição da partilha de pastagens, por forma a limitar os contactos entre rebanhos. Novamente, a sua aplicabilidade é questionável.

Atendendo à influência da proximidade de outros rebanhos e consequente partilha de pastagens entre efetivos na transmissão de BPR entre efetivos e como alternativa às restrições impostas pela segregação dos rebanhos (conforme apresentado acima), a medida de controlo de mais fácil implementação seria a alteração da unidade de intervenção no PEBPR, de tal forma que se considerasse como unidade epidemiológica todos os rebanhos que contactam entre si, medida que está já preconizada no PEBR, sendo possível a definição desta unidade no PISA.net. A cada um destes grupos de rebanhos seria atribuída a mesma classificação sanitária oficial para a BPR (Reviriego et al., 2000). Para este tipo de abordagem será fundamental analisar a estrutura de contactos entre explorações de pequenos ruminantes em Trás-os-Montes, aquando do IE e seu registo.

5.2.6. Contacto dos efetivos com espécies silváticas

Os resultados do presente estudo sugerem a importância da investigação da circulação de *B. melitensis* em populações silváticas, uma vez que, apesar de a análise sugerir associação entre o contacto com animais silváticos e a ocorrência de infeção, a ocorrência desta não está atualmente relatada em Portugal.

Um estudo anterior, realizado em Espanha, verificou que espécies silváticas de ruminantes não assumem um papel relevante na transmissão de *B. abortus* e *B. melitensis* a espécies domésticas de ruminantes. Porém, no mesmo estudo, foi isolado *B. melitensis* biovar 1 numa cabra-montesa (*Capra pyrenaica*), o que demonstra a circulação do agente em populações de espécies silváticas na mesma região (Muñoz et al., 2010).

Mais recentemente, em França, confirmou-se a existência de elevadas seroprevalências (> 45%) de *B. melitensis* em populações de cabras-montesas, confirmando a persistência do agente em populações silváticas. Neste estudo, os autores sugerem a ocorrência de um surto de brucelose em populações de ruminantes domésticos, com origem na população de cabras-montesas local. Este terá sido o primeiro relato da transmissão de *B. melitensis* de espécies silváticas para ruminantes domésticos e da sustentabilidade da infeção em populações de cabras-montesas (Mick et al., 2014).

O estatuto de espécie protegida de certas espécies silváticas suscetíveis, como é o caso da cabra-montesa, é um fator que dificulta a aplicação de potenciais medidas de controlo e erradicação, bem como da investigação do papel destas espécies na epidemiologia da brucelose (Mick et al., 2014).

Em Portugal, o real contributo das espécies silváticas, reconhecidas como hospedeiros reservatórios para BPR (Crespo León, 1994a), na manutenção de infeções por *B. melitensis* nas populações de pequenos ruminantes domésticos é desconhecido.

Em contrapartida, verificou-se no presente estudo que também era frequente o contacto com espécies de carnívoros selvagens. Estes animais adquirem infeção facilmente, por ingestão de produtos infetados, disseminando posteriormente o agente no meio ambiente, por deslocamento destes produtos, ou eventual excreção durante e após o parto. Contudo, o seu contributo para a epidemiologia da BPR tem efeitos muito localizados (Crespo León, 1994a).

Por outro lado, é possível que o contacto dos rebanhos com espécies silváticas estivesse relacionado com o tipo de manejo praticado na exploração, uma vez que, geralmente, as maiores populações de espécies silváticas se encontram em zonas florestais, que muitas vezes servem de pastagem aos rebanhos da região transmontana. Assim sendo, a significância desta variável poderá ser entendida como uma consequência da maior distância percorrida por estes rebanhos em busca de pasto, o que implicaria uma maior área partilhada com outros rebanhos, sob a forma de caminhos ou pastagem. Contudo, no presente estudo, não foi analisada a distância percorrida pelos rebanhos nas deslocações para as pastagens utilizadas nem a área total de pastagem utilizada pelos mesmos.

5.2.7. Contacto entre efetivos de pequenos ruminantes

A associação entre a ocorrência de BPR nos rebanhos de pequenos ruminantes e o contacto destes com outros rebanhos tem sido reportada por outros autores (Reviriego et al., 2000; Lithg-Pereira et al., 2004; Al-Majali, 2005). Outros ainda reportaram o regime de produção extensivo dos rebanhos como fator de risco para a BPR (Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999), sendo possível que este tipo de regime promova um maior contacto entre rebanhos. O contacto entre rebanhos facilitará a transmissão de infeção a animais suscetíveis (Crespo León, 1994a).

A inexistência de associação estatisticamente significativa, neste estudo, entre a ocorrência de infeção nos efetivos analisados e o seu contacto com outros efetivos de ruminantes parece contraditória. De facto, existe associação da classificação dos efetivos como infetados tanto com a partilha de pastagens com outros rebanhos, como com o contacto dos efetivos com espécies silváticas, mas não com o contacto com outros efetivos de ruminantes.

Considerando que as respostas a esta questão são credíveis, a transmissão do agente poderá ter ocorrido sobretudo por contactos indiretos entre os animais envolvidos.

É importante referir que a probabilidade de transmissão de infeção por contacto com rebanhos espanhóis é reduzida, ainda que não tenha sido alvo de análise neste estudo. Dada a localização geográfica dos rebanhos analisados, muitos deles situados a pouca distância da

fronteira com Espanha, poderia colocar-se essa hipótese. Contudo, verificou-se que as comarcas da província de Ourense (que cobrem a fronteira norte do distrito de Vila Real) não apresentaram casos positivos de BPR, em 2015 (Anexo XIII).

5.2.8. Contacto próximo dos efetivos com cães

No que respeita ao contacto próximo dos efetivos com cães, será interessante investigar o papel deste tipo de contacto interespécies na ocorrência de BPR nos efetivos, dada a confirmação, no presente estudo, de relações estatisticamente significativas a este nível.

Este tipo de contacto foi reportado por outros estudos como não significativo para a ocorrência de infeção em efetivos de pequenos ruminantes (Al-Majali, 2005). Porém, e conforme referido anteriormente, está descrito na literatura a possibilidade de infeção dos cães por *B. melitensis*, habitualmente por ingestão de material infetado (Anexo IX – Figura 28), com posterior excreção do agente (European Commission, 2001; Corbel, 2006).

Com efeito, estudos sugerem o papel dos cães na transmissão de *B. melitensis* a bovinos domésticos e destes a humanos. Verificou-se a presença de infeção nestes cães, considerando como possível fonte de infeção para estes rebanhos vizinhos não supervisionados (Mishal et al., 1999).

Foi comprovada, noutro estudo, a associação da presença de cães na exploração com a ocorrência de infeção por *B. melitensis* em efetivos de pequenos ruminantes, verificando-se a seropositividade nestes cães (Mikolon, Gardner, Hernandez De Anda, & Hietala, 1998). Os autores consideram a hipótese da transmissão de infeção dos cães para o rebanho, através de aborto nas cadelas, conforme sugerido igualmente por Forbes (1990), que propõe a interrupção do contacto entre os cães e o rebanho, por forma a prevenir a transmissão. Por outro lado, os autores admitem que a associação verificada terá sido provavelmente resultado da exposição dos cães da exploração às placentas ou fetos abortados dos pequenos ruminantes infetados e não da exposição dos pequenos ruminantes aos cães (Mikolon et al., 1998). Tal hipótese poderá explicar a associação entre o contacto próximo entre os efetivos e cães e a ocorrência de infeção nos efetivos, verificada no presente estudo.

Também em Portugal se confirmou a associação do acesso de cães às placentas dos animais dos respetivos efetivos com a ocorrência de BPR, sugerindo a importância do reforço das medidas preventivas perante partos no efetivo (Martins, 2001).

Por outro lado, esta associação poderia dever-se ao facto de existirem relações estatisticamente significativas tanto entre a presença de cães na exploração, como entre o contacto próximo dos cães com o rebanho e a dimensão do rebanho (Anexo XII). Assim sendo, a presença de BPR nos rebanhos em questão poderia ser consequência da elevada dimensão

dos mesmos e não diretamente da coincidente presença de cães e seu contacto próximo com os efetivos, nestes rebanhos de maior dimensão.

5.2.9. Observação da prática de irregularidades sanitárias na exploração

A análise deste tipo de práticas não foi realizada no passado, contudo a elevada associação que apresenta com a confirmação de BPR nos efetivos sugere uma mais cuidada investigação dos fatores envolvidos nesta dinâmica.

É certo que algumas das irregularidades observadas consistem em práticas de risco que promovem a transmissão do agente, já outras não o serão diretamente, embora partilhem associação com a ocorrência de infeção nos efetivos. As últimas poderão insinuar a ocorrência de outras práticas de risco, não verificadas diretamente. Assim sendo, é legítimo assumir que esta variável caracteriza, de forma fidedigna, as explorações em que se verifica a prática de irregularidades sanitárias como explorações com perfil de risco.

A existência de uma associação estatisticamente significativa entre a prática de irregularidades sanitárias e a ocorrência de infeção nos rebanhos das explorações da amostra estudada reflete sobretudo o risco que o não cumprimento dos procedimentos previstos no PEBPR representa para a transmissão de BPR entre efetivos e/ou a manutenção de uma situação de infeção nos mesmos.

5.3. Conclusões

A importância principal do presente estudo está relacionada com a obtenção, através do mesmo, de informação geralmente não obtida por entidades reguladoras, dada a sua sensibilidade e potencial lesivo para as fontes. A análise desta informação permitiu identificar fatores de risco responsáveis pela transmissão e manutenção de BPR nos efetivos de pequenos ruminantes e esclarecer algumas das causas de insucesso na erradicação da doença.

Desta forma, foram apresentados alguns fatores de risco bem conhecidos, mas também verificados novos padrões que favorecem a ocorrência de BPR, sendo sugeridas possíveis causas dos mesmos e apresentadas propostas de resolução. Seria importante a introdução, no PEBPR, de medidas específicas que visem estas questões, até então não abordadas por este plano, com o intuito de contribuir para o seu aperfeiçoamento. A eliminação de BPR nos rebanhos onde se identifique a presença dos fatores de risco identificados deverá permitir um melhor controlo da doença.

Um reforço das medidas de vigilância epidemiológica deverá ser aplicado sobretudo a rebanhos de grandes dimensões, naqueles em que é favorecido o contacto direto ou indireto com outros animais e nas explorações de proprietários cujo cumprimento dos preceitos do PEBPR e/ou colaboração com as equipas médico-veterinárias seja reduzida. De facto, talvez a medida mais importante a implementar seja o investimento na adequada educação e comunicação com os proprietários dos rebanhos, através da pessoa do médico veterinário, aliada à garantia da sua supervisão e participação nas intervenções junto dos rebanhos. Por outro lado, as OPP deverão assegurar a identificação eletrónica de todos os animais presentes nos rebanhos e esta deverá ser fiscalizada, por forma a impedir a prática de irregularidades nas transações de animais.

Considerando o cenário relatado e os resultados da análise do presente estudo, pode afirmar-se que a dinâmica da BPR na amostra analisada – que reflete, em certo grau, a realidade da mesma em Trás-os-Montes – é uma questão complexa, com importantes vertentes socio-económico-culturais. O baixo nível de escolaridade dos proprietários das explorações proporcionava uma dificuldade na compreensão das medidas de controlo aplicadas aos rebanhos, o que, aliado à relutância em modificar certas práticas de risco, resultava numa deficiente colaboração com as equipas médico-veterinárias. Em contrapartida, os recursos financeiros de que estes dispunham para investir no melhoramento das condições de manejo eram extremamente limitados.

A conjugação destes fatores contribui grandemente para o incumprimento do PEBPR por parte dos proprietários. Aliados a este, verificou-se também que há aspetos a melhorar no que respeita à aplicação das medidas do mesmo plano por parte das OPP. Com efeito, constatou-se que não se tratava da necessidade de investir no aperfeiçoamento de medidas sanitárias, mas sim da sua correta aplicação. No seu conjunto, pode este deficiente cumprimento das medidas do PEBPR justificar o facto de as prevalências de BPR em explorações e animais na DSAVR Norte terem sido sempre superiores às do restante território continental, ao longo dos anos. Por outro lado, a existência de serologia positiva em animais vacinados ou mesmo em animais não vacinados, na ausência de qualquer sinal de doença, decorrente de interferência da estirpe vacinal e contaminação ambiental pela mesma, constitui uma grande adversidade para o sucesso do PEBPR, considerando a dificuldade dos proprietários em compreender estas situações.

Contudo, a avaliação dos indicadores alcançados nos últimos anos revela um bom progresso nos resultados do PEBPR. É importante ter em conta que a redução prevista nos casos de BPR poderia ser menor, uma vez que Portugal está perto da erradicação, sendo o último passo da erradicação mais difícil de gerir e alcançar.

As situações mais difíceis de regular, que contribuem para a persistência de BPR, estão relacionadas com o controlo de contactos entre rebanhos, considerando o tipo de sistemas de

produção. Assim sendo, sugere-se a análise da rede dinâmica de contactos entre explorações de pequenos ruminantes, contemplando a evolução temporal do seu estatuto sanitário para a BPR, com o intuito de investigar a transmissão de infeção entre estas explorações e identificar quais as explorações com maior número de contactos na rede e quais as que mais contribuem para a transmissão de infeção, por forma a serem alvo de medidas adicionais de controlo e vigilância. Neste tipo de análise deverão ser consideradas as explorações pertencentes a negociantes de gado, pelo maior risco que representam para a transmissão de BPR, devido ao grande número de transações de animais que efetuam.

A prática de muitas destas irregularidades resulta da tentativa, por parte dos proprietários, em contornar as limitações impostas pelo PEBPR, como resultado de uma insuficiente compreensão dos motivos do mesmo. É assim importante não só a correta aplicação do PEBPR mas também o estabelecimento de relações de confiança, assentes numa boa comunicação, entre os serviços médico-veterinários e os proprietários dos rebanhos.

Bibliografia

- Agresti, A. (2002). *Categorical data analysis* (2nd ed.). New York: Wiley-Interscience.
- Al-Majali, A. M. (2005). Seroepidemiology of caprine Brucellosis in Jordan. *Small Ruminant Research*, 58(1), 13–18.
- Blasco, J. M. (2010). Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi*, 31(1), 145–165.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V., & O’Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*, 4(1), 58–64.
- Burnham, K., & Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach* (2nd ed.). Springer.
- Castañó, M. J., Navarro, E., & Solera, J. S. (2016). *International Encyclopedia of Public Health* (Vol. 1). (2nd ed.). Academic Press.
- Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., & Vizcaíno, N. (1996). Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS microbiology letters*, 145(1), 1–8.
- Coelho, A. C. (2007). *Estudo seroepidemiológico da brucelose ovina e caprina na região de Trás-os-Montes e Alto-Douro*. Tese de Doutoramento. Vila Real: UTAD.
- Coelho, A. M., Díez, J. G., & Coelho, A. C. (2014). Brucellosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5), 1–31.
- Coelho, A. M., Coelho, A. C., Roboredo, M., & Rodrigues, J. (2007). A case-control study of risk factors for brucellosis seropositivity in Portuguese small ruminants herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 82(3–4), 291–301.
- Coelho, A. M., Coelho, A. C., Góis, J., Pinto, M. de L., & Rodrigues, J. (2008). Multifactorial correspondence analysis of risk factors for sheep and goat brucellosis seroprevalence. *Small Ruminant Research*, 78(1–3), 181–185.
- Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. Geneva: World Health Organization.
- Crespo León, F. (1994a). *Brucelosis ovina y caprina*. Paris: Office International des Epizooties.
- Crespo León, F. (1994b). Influencia de los Elementos y Factores Geográficos en la Epidemiología de la Brucelosis del Ganado Ovino y Caprino. *Papeles de Geografía*, 20, 189–209.
- Dalrymple, M. (1993). Model for assessing the risk of introducing brucellosis into a brucellosis-free area. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 12(4), 1175–1186.
- Decreto-lei n.º 39209 de 14 de maio de 1953. (1953). *Diário da República, Série I de 1953*. Ministério da Economia - Direção-Geral dos Serviços Pecuários. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 244/2000 de 27 de setembro de 2000. (2000). *Diário da República, Série I-A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de julho de 2006. (2006). *Diário da República, Série I de 2006*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV]. (2018). *Programa de erradicação da tuberculose bovina, brucelose bovina e brucelose dos ovinos e caprinos (B. melitensis)*. Portugal: DGAV.

Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância. (2017a). *Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016, Volume I - Portugal*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.

Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância. (2017b). *Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016, Volume II - Regiões*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.

Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional Norte [DSAVRN]. (2012). *Brucelose dos pequenos ruminantes: programa especial de erradicação para o ano 2012 em Trás-os-Montes* (No. BPR/PT – DSVRN/2012). Portugal: DSAVRN.

Diretiva 91/68/CEE do Conselho, de 28 de janeiro de 1991. Comunidade Económica Europeia.

European Food Safety Authority [EFSA] & European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC]. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12).

Elgammal, A., Duraiswami, R., Harwood, D., & Davis, L. S. (2002). Background and foreground modeling using nonparametric kernel density estimation for visual surveillance. *Proceedings of the IEEE*, 90(7), 1151–1163.

European Commission. (2001). *Brucellosis in Sheep and Goats (Brucella melitensis)* (No. SANCO C.2/AH /R23/2001).

European Commission. (2012). *Eradication programme for Sheep and Goat Brucellosis (B.melitensis)* (No. SANCO/10857/2012).

Food and Agriculture Organization [FAO], World Organisation for Animal Health [OIE] & World Health Organization [WHO]. (2006). *The Control of neglected zoonotic diseases a route to poverty alleviation, report of a joint WHO/DFID-AHP meeting, 20 and 21 September 2005, WHO Headquarters, Geneva, with the participation of FAO and OIE*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Forbes, L. B. (1990). Brucella abortus infection in 14 farm dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(6), 911–916.

Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckert, A. (2007). Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), 2688–2693.

Gazilion. (2014a). *Freguesias do concelho de Boticas*. Acedido em Fev. 12, 2018, disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Boticas_freguesias_2013.svg

Gazilion. (2014b). *Freguesias do concelho de Chaves*. Acedido em Fev. 12, 2018, disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chaves_freguesias_2013.svg

Gazilion. (2014c). *Freguesias do concelho de Valpaços*. Acedido em Fev. 12, 2018, disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Valpaços_freguesias_2013.svg

Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., ... Letesson, J.-J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 118–131.

Godfroid, Jacques, Al Dahouk, S., Pappas, G., Roth, F., Matope, G., Muma, J., ... Skjerve, E. (2013). A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(3), 241–248.

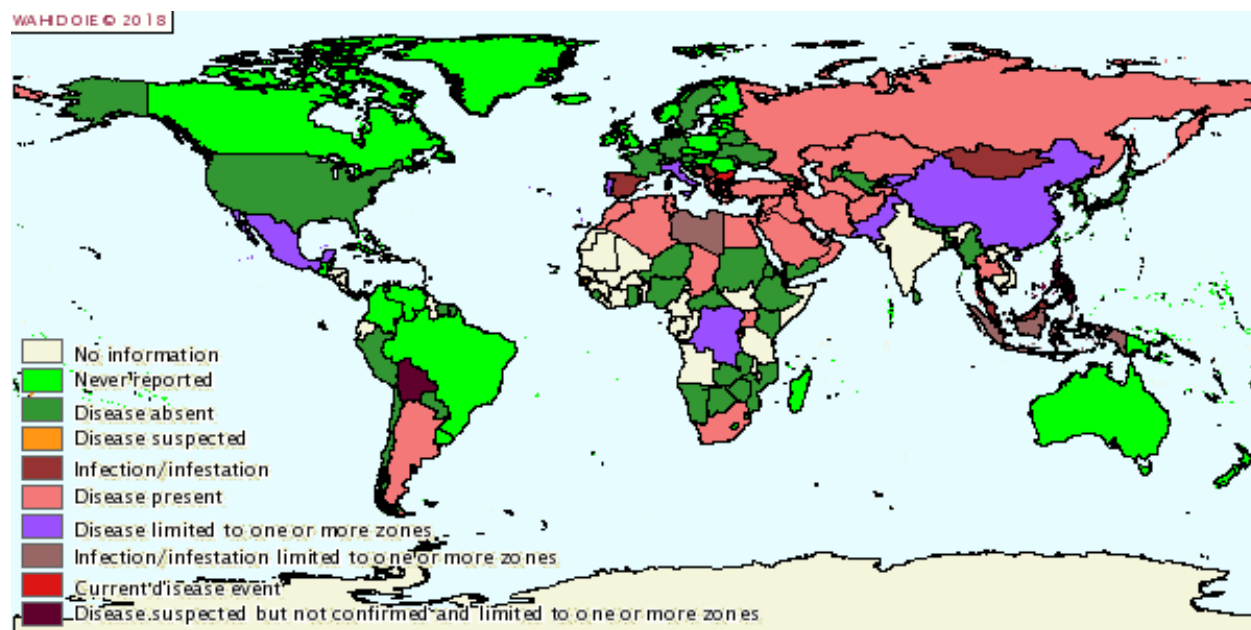
- Godfroid, Jacques, & Käsbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 135–145.
- Gonçalves, L.B. (1993). *Brucelose – Contribuição ao estudo da zoonose na região agrária de Trás-os-Montes (Bragança, Vila Real e Viseu)*. Dissertação de Mestrado em Extensão e Desenvolvimento Rural. Vila Real: Departamento de Economia e Sociologia – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Houe, H., Ersbøl, A. K., & Toft, N. (2004). *Introduction to Veterinary Epidemiology*. Division of Epidemiology, Department of Large Animal Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark: Biofolia.
- Hugh-Jones, M. E., Hubbert, W. T., & Hagstad, H. V. (1995). *Zoonoses: Recognition, Control, and Prevention*. Iowa: Iowa State University Press.
- Kaltungo, B., Saidu, S., Musa, I., & Baba, A. (2014). Brucellosis: A Neglected Zoonosis. *British Microbiology Research Journal*, 4(12), 1551–1574.
- Lithg-Pereira, P. L., Mainar-Jaime, R. C., Álvarez-Sánchez, M. A., & Rojo-Vázquez, F. A. (2001). Evaluation of official eradication-campaigns data for investigating small-ruminant brucellosis in the province of León, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, (51), 215–225.
- Lithg-Pereira, P. L., Rojo-Vázquez, F. A., & Mainar-Jaime, R. C. (2004). Case-control study of risk factors for high within-flock small-ruminant brucellosis prevalence in a brucellosis low-prevalence area. *Epidemiology and Infection*, 132(2), 201–210.
- Mainar-Jaime, R. C., & Vázquez-Boland, J. A. (1999). Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, 193–205.
- Martins, M. (2001). *Avaliação dos factores limitantes à obtenção do estatuto de área indemne de brucelose nos pequenos ruminantes no sul da Beira Interior (Portugal)*. Dissertação de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Martins, M., & Vaz, Y. (2002). *Brucella melitensis* em pequenos ruminantes – erradicação e certificação sanitária [Brucella melitensis in small ruminants – eradication and sanitary certification]. *Congresso de Ciências Veterinárias, SPCV, Oeiras, 10-12 Out.* (pp. 271-278).
- Megersa, B., Biffa, D., Niguse, F., Rufael, T., Asmare, K., & Skjerve, E. (2011). Cattle brucellosis in traditional livestock husbandry practice in Southern and Eastern Ethiopia, and its zoonotic implication. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 24.
- Mick, V., Carrou, G. L., Corde, Y., Game, Y., Jay, M., & Garin-Bastuji, B. (2014). Brucella melitensis in France: Persistence in Wildlife and Probable Spillover from Alpine Ibex to Domestic Animals. *PLoS ONE*, 9(4), e94168.
- Mikolon, A. B., Gardner, I. A., Hernandez De Anda, J., & Hietala, S. K. (1998). Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1–4), 185–195.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2016a). *Mapa de la incidencia máxima en animales por comarcas, año 2015 – Brucelosis ovina y caprina*. Acedido em Fev. 21, 2018, disponível em: <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/>
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2016b). *Mapa de la prevalencia máxima en rebaños por comarcas, año 2015 – Brucelosis ovina y caprina*. Acedido em Fev. 21, 2018, disponível em: <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/>

- Mishal, J., Ben-Israel, N., Levin, Y., Sherf, S., Jafari, J., Embon, E., & Sherer, Y. (1999). Brucellosis outbreak: analysis of risk factors and serologic screening. *International Journal of Molecular Medicine*.
- Muñoz, P. M., Boadella, M., Arnal, M., de Miguel, M. J., Revilla, M., Martínez, D., ... Gortázar, C. (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infectious Diseases*, 10, 46.
- Nicoletti, P. (2010). Brucellosis: past, present and future. *Prilozi*, XXXI(1), 21-32.
- World Organisation for Animal Health [OIE]. (2016). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 2: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* (6th ed). Paris: OIE.
- OIE. (2018). *Old classification of diseases notifiable to the old list B*. Acedido em Abr. 20, 2018, disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/the-world-animalhealth-information-system/old-classification-of-diseases-notifiable-to-the-oie-list-b/>
- Paulin, L. M. (2003). Brucelose. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 70(2), 239–249.
- Petrie, A. & Watson, P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science* (3rd ed.). London: Wiley-Blackwell
- Quantum GIS Development Team. (2017). Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project (Version 2.8.14).
- R Core Team. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing (R version 3.4.2). Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Saunders Ltd.
- Reviriego, F. J., Moreno, M. A., & Domínguez, L. (2000). Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(3–4), 167–173.
- Robinson, A. (2003). *Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance*. Rome: FAO.
- Solera, J. S., & Castaño, M. J. (2008). Brucellosis. In H. K. (Kris) Heggenhougen (Ed.), *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 357–369). Oxford: Academic Press.
- Spickler, A. R. (2009a). *Brucellosis*. Iowa: Center for Food Security and Public Health.
- Spickler, A. R. (2009b). *Ovine and Caprine Brucellosis: Brucella melitensis*. Iowa: Center for Food Security and Public Health.
- Thrusfield, M. V. (2007). *Veterinary epidemiology* (3rd ed.). Oxford: Blackwell Science.
- Vaz, Y.M. (1996). *Analysis of policies for the eradication of brucellosis from sheep and goats in Portugal*. Ph.D. Thesis. Reading: Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, Department of Agriculture, University of Reading.
- Yang, C., Duraiswami, R., Gumerov, N. A., & Davis, L. (2003). Improved fast gauss transform and efficient kernel density estimation. *Proceedings of the Ninth IEEE International Conference on Computer Vision*.
- Zorn, C. (2005). A Solution to Separation in Binary Response Models. *Political Analysis*, 13(02), 157–170.

ANEXOS

Anexo I – Distribuição geográfica de *B. melitensis* entre 2016 e 2017

Figura 18. Distribuição mundial de brucelose por *B. melitensis* entre 2016 e 2017 (OIE, 2018).



Países com doença clínica em 2016-2017: Afeganistão, Albânia, Argélia, Argentina, Arménia, Bósnia-Herzegovina, Burundi, Egito, Macedónia*, Grécia, Irão, Iraque, Israel, Jordânia, Cazaquistão, Kuwait, Omã, Paraguai, Qatar*, Rússia, Arábia Saudita, Somália, Síria, Tajiquistão, Tanzânia, Tailândia, Tunísia, Turquia, Uganda*, China, Palestina (OIE, 2018).

Países com doença restringida a determinadas regiões em 2016-2017: Bulgária, Croácia, Itália, Quirguistão, México, Paquistão*, Portugal (OIE, 2018).

Países com presença de infeção sem doença clínica em 2016-2017: Sudão**, Azerbaijão, Mongólia, Sérvia, Sérvia e Montenegro, Espanha* (OIE, 2018).

Países com infeção restringida a determinadas regiões em 2016-2017: França**, Indonésia, Líbia, Malásia, Emirados Árabes Unidos* (OIE, 2018).

Países com suspeita de doença em 2016-2017: Nigéria**, República Dominicana, Guiné Equatorial, Guiné-Bissau*, Maláui, Ruanda, São Vicente e Granadinas (OIE, 2018).

(*) Afetando tanto espécies domésticas como silváticas.

(**) Afetando apenas espécies silváticas.

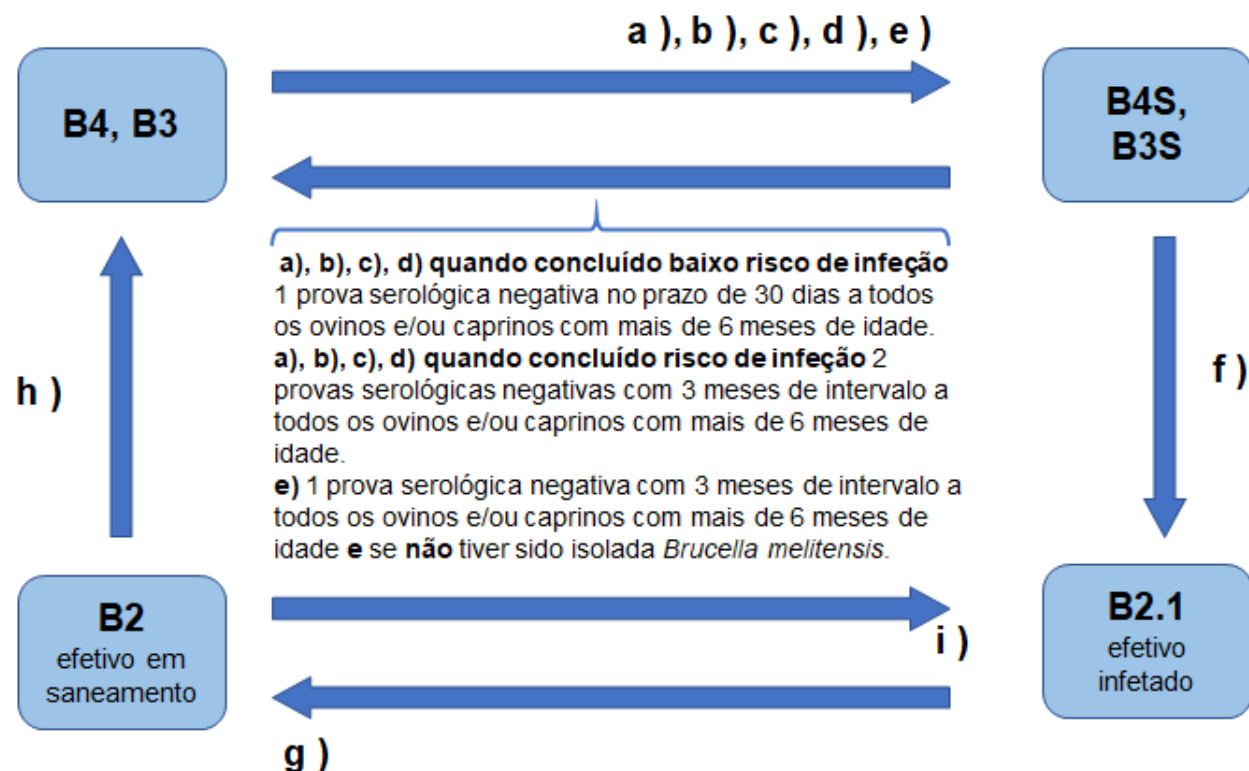
Anexo II – Classificação e fluxograma dos estatutos sanitários oficiais para BPR em Portugal

A classificação sanitária oficial de animais e rebanhos é realizada de acordo com a Diretiva 91/68/CEE do Decreto-Lei nº 244/2000 e esta classificação poderá ser mantida, suspensa ou alterada. As classificações sanitárias existentes são as seguintes:

- B2.1: exploração em que se tenha confirmado a presença de animais infetados, nos quais tenham sido isoladas e identificadas bactérias do género *Brucella*;
- B2: não indemne de brucelose;
- B3.S: quando o estatuto de indemne de brucelose tenha sido suspenso;
- B3: indemne de brucelose;
- B4.S: quando o estatuto de oficialmente indemne de brucelose tenha sido suspenso;
- B4: oficialmente indemne de brucelose.

A metodologia para a atribuição, manutenção e alteração do estatuto sanitário definida pelo PEBPR é a seguinte:

Figura 19. Fluxograma dos estatutos sanitários oficiais para BPR em Portugal (DGAV, 2018).



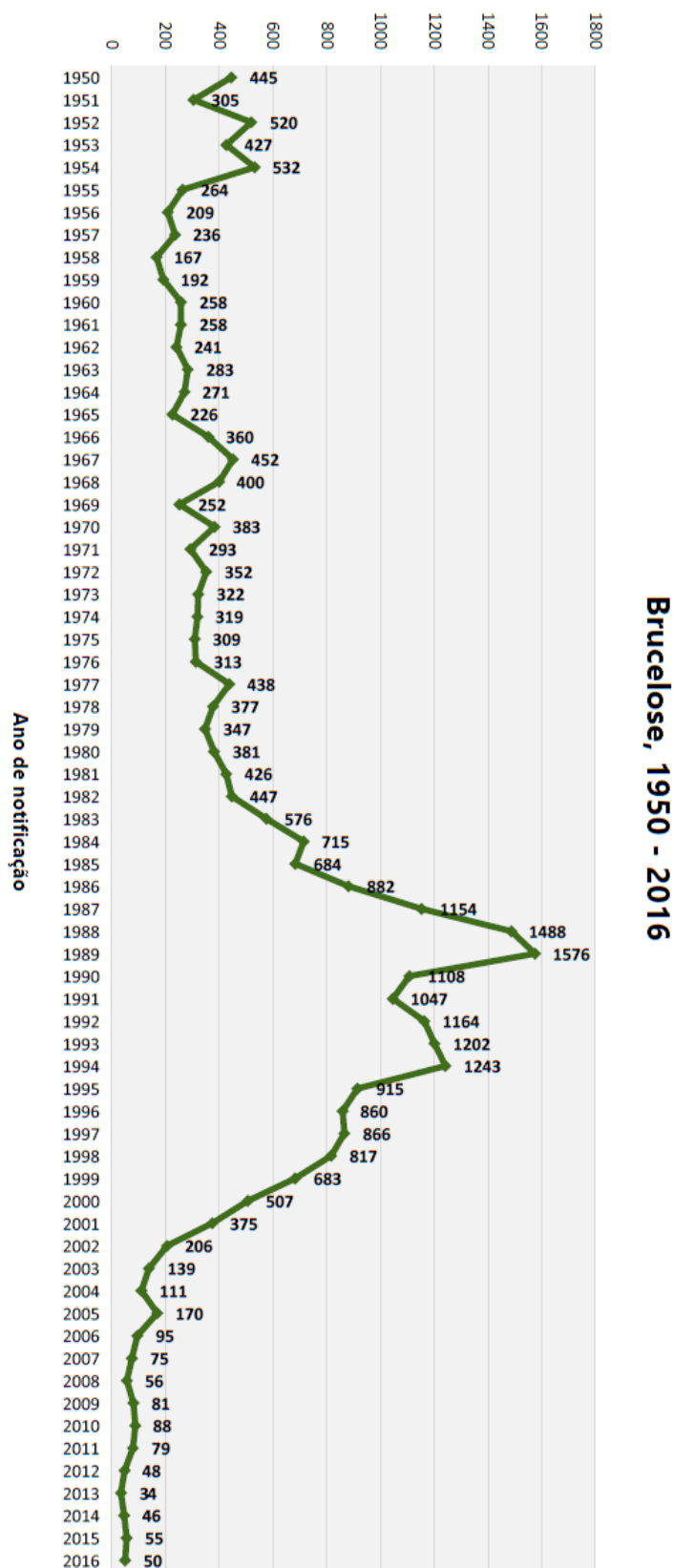
- a) Qualquer motivo considerado pertinente para a luta contra a brucelose;
- b) Sempre que as medidas do PEBPR não estejam a ser cumpridas;
- c) Se o IE determinar a possibilidade de infeção;
- d) Quando não estão reunidas condições para serem classificados como indemnes ou oficialmente indemnes;
- e) Um controlo serológico positivo;
- f) Isolamento de *Brucella melitensis*;
- g) Duas reinspecções sucessivas com resultado negativo após abate (aos 30 e 60 dias) a todos os ovinos e/ou caprinos com mais de 6 meses de idade (18 meses de idade nos vacinados);
- h) Dois controlos totais negativos com 3 meses de intervalo a todos os ovinos e/ou caprinos com mais de 6 meses de idade (18 meses de idade nos vacinados) (*);
- i) Adquire novamente estatuto infetado B2.1 e retoma os procedimentos da alínea g.

(*) Se forem obtidos resultados positivos num dos controlos realizados na alínea h, procede-se ao abate dos ovinos e/ou caprinos positivos com recolha de amostras e efetua-se em todos os ovinos e/ou caprinos com mais de 6 meses de idade um controlo, 30 dias após o abate. Após este controlo: prossegue-se com os procedimentos da alínea h, se não tiver sido isolada *Brucella melitensis*; prossegue-se com os procedimentos da alínea i se for isolada *Brucella melitensis*.

Sempre que se verificar isolamento de *B. melitensis* o efetivo adquire estatuto sanitário B2.1.

Anexo III – Prevalências de brucelose em Portugal

Figura 20. Cronologia dos casos de brucelose humana notificados em Portugal (Direção de Serviço de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia e Vigilância, 2017a, p.20)



Anexo IV – Modelo do inquérito epidemiológico utilizado no estudo

Inquérito Epidemiológico – Brucelose dos Pequenos Ruminantes

Parte I – questões a colocar ao proprietário

Questionário nº _____ Data ____/____/____

1) Identificação do proprietário

Nome: _____

Idade: _____ anos Sexo: M ☐ F ☐

Morada: _____

Ocupação: _____

Contacto: _____

2) Identificação da exploração

Morada: _____

Freguesia: _____ Concelho: Chaves (3) Distrito: Vila Real (17)

Marca oficial da exploração (ME): _____

OPP: Associação Bons e Valentes (214) Sócio nº _____ Não sócio OPP ☐

Registo fotográfico: Sim ☐ Não ☐

3) Outras propriedades registadas pelo mesmo proprietário

Sim ☐

Não ☐

Apenas pastagem ☐

Localização das pastagens: _____

3.1) Efetua transferências de animais entre as suas explorações?

Sim ☐

Não ☐

Apenas para a pastagem ☐

4) Efetivo animal da exploração

4.1) Espécies existentes na exploração

Ovinos ☐ Caprinos ☐ Bovinos ☐ Outros: _____

4.2) Regime de Produção

Intensivo ☐ Semi-Intensivo ☐ Extensivo ☐

4.3) Aptidão produtiva do efetivo

Leite ☐ Carne ☐ Misto ☐

4.4) Constituição atual do efetivo

Espécie	Aptidão	Nº de ♂ A	Nº de ♀ A	Nº de ♂ J	Nº de ♀ J	Total
Ovinos	Leite					
	Carne					
Caprinos	Leite					
	Carne					
Bovinos	Leite					
	Carne					
Outros: _____						

Nota: Adultos (A) – animais com > 6 meses; Jovens (J) – animais com idade < 6 meses.

5) Caracterização sanitária do efetivo relativamente à brucelose

5.1) Profilaxia - Vacinação contra a brucelose: Sim ☐ Não ☐

5.2) Tem conhecimento da ocorrência de casos positivos de brucelose no efetivo nos últimos 12 meses? Sim ☐ Não ☐ Nunca teve casos de BPR ☐

5.3) Procede à separação dos animais declarados infetados do resto do rebanho?

Sim ☐ Não ☐ Nunca teve casos de BPR ☐

6) Trânsito de animais

6.1) Entrada de animais nos últimos 12 meses Sim ☐ Não ☐

Ovinos ☐ Caprinos ☐ Bovinos ☐ Outros: _____

6.2) Via de aquisição dos animais

Outro proprietário ☐ Negociante ☐ Feira / Mercado ☐ Importação ☐

6.3) Fez o isolamento de todos os animais introduzidos na exploração?

Sim ☐ Não ☐

Duração do isolamento: _____

Local onde realiza o isolamento: _____

6.4) Saída de animais vivos nos últimos 12 meses (que não para abate)

Sim ☐ Não ☐

6.5) Destino dos animais vendidos: _____

7) Características de manejo da exploração

7.1) Higiene e desinfecção

- Frequência da remoção de: _____ Destino: _____
Estrumes/camas: _____
- Regularidade os processos: _____ Produto utilizado: _____
Desinfecções: _____ Nunca ☐ _____
Desinsetizações: _____ Nunca ☐ _____
Desratizações: _____ Nunca ☐ _____
- Destino dos nados mortos, recém-nascidos mortos, fetos, abortos e membranas fetais:
 - Nados mortos/recém-nascidos mortos:
Enterrado ☐ Lixo ☐ Inceneração ☐ Dá aos cães ☐
Recolhido pelos serviços oficiais ☐ Outro: _____
 - Fetos, abortos e membranas fetais:
Enterrado ☐ Lixo ☐ Inceneração ☐ Dá aos cães ☐
Recolhido pelos serviços oficiais ☐ Outro: _____

7.2) Reprodução

- Recorre à inseminação artificial? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐
- Recorre à transferência de embriões? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐
- Recorre à troca de reprodutores com outros proprietários?
Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐
- Origem dos animais reprodutores: _____
- Pratica sazonalidade de partos? Sim ☐ Não ☐
- Presta cuidados de assistência ao parto? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐
- Procede ao isolamento das fêmeas gestantes?
Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐
- Antes do parto ☐ Depois do parto ☐

7.3) Alimentação

- Origem da água de bebida:
Canalizada ☐ Ambiente (rio, lago, lameiros, albufeira, etc.) ☐
Fontes públicas ☐ Captação/Poço ☐ Outro: _____
- Usa comedouros e bebedouros? Sim ☐ Não ☐
Outros animais têm acesso aos mesmos? Sim ☐ Não ☐
Número de comedouros: _____ Número dos bebedouros: _____

Altura dos comedouros/bebedouros: _____

Características: _____

• Alimentação dos jovens:

Alimenta/Alimentou crias com leite/colostró de ♀ infetadas?

Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐ Nunca teve casos de BPR ☐

• Faz fenação dos pastos? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐

• Compra feno/silagem/forragem de fora? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐

• Pratica a transumância? Sim ☐ Não ☐

Localização: _____

• Os animais alimentam-se de pastagem? Sim ☐ Não ☐ Por vezes ☐

Estas pastagens são partilhadas com outros rebanhos? Sim ☐ Não ☐

Identifique os efetivos com quem partilha a pastagem: _____

• Tipos de pastagens em que o rebanho pasta:

Terrenos próprios ☐ Terrenos arrendados ☐ Terrenos baldios ☐ Montes ☐

8) Contacto do efetivo com outros animais

8.1) Contacto direto com ruminantes de outras explorações: Sim ☐ Não ☐

ME	Espécies	Tipo de contacto	Situações	Observações
	Ovinos <input type="checkbox"/> Caprinos <input type="checkbox"/> Outros: _____	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	Vedações <input type="checkbox"/> Transumâncias <input type="checkbox"/> Pastos comuns <input type="checkbox"/> Caminhos <input type="checkbox"/>	
	Ovinos <input type="checkbox"/> Caprinos <input type="checkbox"/> Outros: _____	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	Vedações <input type="checkbox"/> Transumâncias <input type="checkbox"/> Pastos comuns <input type="checkbox"/> Caminhos <input type="checkbox"/>	
	Ovinos <input type="checkbox"/> Caprinos <input type="checkbox"/> Outros: _____	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	Vedações <input type="checkbox"/> Transumâncias <input type="checkbox"/> Pastos comuns <input type="checkbox"/> Caminhos <input type="checkbox"/>	

8.1.1) Tipo de separação das explorações vizinhas:

Ausência de separação física ☐ Cerca simples ☐ Paredes do curral ☐

Cerca dupla ☐ Muro ☐ Outro: _____

8.2) Contacto direto com animais silváticos: Sim ☐ Não ☐

Espécies	Tipo de contacto	Observações
	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	
	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	
	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	
	Acidental <input type="checkbox"/> Pouco frequente <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/>	

8.3) Contacto direto com outras espécies

Existem cães na exploração? Sim ☐ Não ☐

Os cães não têm contacto próximo com o rebanho/estão presos ☐

Os cães têm contacto próximo com o rebanho ☐

Os cães comem/têm acesso aos produtos do parto e abortos? Sim ☐ Não ☐

Existem outras espécies animais na exploração?

Sim ☐ Não ☐ Quais? _____

Têm contacto com o rebanho? Sim ☐ Não ☐

8.4) Contacto com humanos

Contrata o serviço de trabalhadores que não o Médico Veterinário? Sim ☐ Não ☐

Observações: _____

Que tipos de serviço prestam? _____

9) Venda/Consumo de produtos da exploração

Vende leite? Sim ☐ Não ☐

Destino: _____ Recolha: _____

Vende queijo? Sim ☐ Não ☐ Tipo de queijo: _____

Vende borregos/cabritos/vitelos? Sim ☐ Não ☐

Destino: _____

Consome da produção própria? Sim ☐ Não ☐

Leite cru ☐ Queijo fresco ☐ Queijo curado ☐ Borregos/cabritos/vitelos ☐

Outro: _____

10) Tipo de ordenha praticada na exploração

Ordenha mecânica ☐ Ordenha manual ☐ Não pratica ordenha ☐

11) Ocorrência de casos de infecção humana – últimos 12 meses

11.1) Tem conhecimento dos sintomas de Brucelose humana? Sim ☐ Não ☐

11.2) Tem conhecimento das vias de transmissão de Brucelose dos pequenos ruminantes ao Homem? Sim ☐ Não ☐

11.2) Alguma vez contraiu Brucelose? Sim ☐ Não ☐

12) Intervenções da OPP no rebanho: _____

Parte II – Recolha de dados da exploração

1) Georreferenciação da exploração:

Latitude: N _____; Longitude W _____

2) Caracterização sanitária do efetivo relativamente à brucelose

2.1) Classificação sanitária oficial

2.1.1) Brucelose dos Pequenos Ruminantes:

B1 ☐ B2.1 ☐ B2 ☐ B3 ☐ B3.S ☐

Data de efeito: __/__/____

2.1.2) Brucelose Bovina:

B1 ☐ B2.1 ☐ B2.2 ☐ B3 ☐ B4 ☐

3) Irregularidades sanitárias observadas

Recusa de saneamento ☐ Recusa de marcação de animais positivos ☐

Recusa de levantamento de animais positivos ☐ Recusa de identificação ☐

Violação do sequestro ☐ Compra de animais sem documentação ☐

Outra/Observações: _____

4) Relatório da visita à exploração:

Anexo V – Comparação entre explorações positivas, negativas e duvidosas

Tabela 16. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.

Variáveis	OR	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p	Proporção
Tamanho do rebanho	7.921	2.231 : 36.370	< 0.05	0.826
Presença de ovinos	3.066	0.606 : 30.447	0.209	0.913
Presença de ovinos de leite	0	0 : 96.508	1	0
Presença de caprinos	1.562	0.523 : 4.668	0.451	0.478
Rebanho misto	3.858	1.098 : 14.012	0.031	0.391
% de machos no efetivo	3.548	0.430 : 166.386	0.434	0.957
% de adultos no efetivo	8.141	0.614 : 447.321	0.069	0.130
% de animais de reposição	4.504	1.276 : 20.499	0.011	0.826
% de animais vacinados	2.563	0.284 : 124.313	0.667	0.957
% de animais eID* no efetivo	0.281	0.048 : 1.126	0.059	0.130
% de animais comprados	1.430	0.463 : 4.802	0.610	0.696
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m)**	227.647	31.104 : 3597.648	< 0.05	0.913
Isolamento de animais infetados	Inf	0.010 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	0.832	0.228 : 2.726	0.792	0.261
Venda de animais (12 m)**	10.769	1.501 : 476.372	0.009	0.957
Partilha de reprodutores	0	0 : 1.175	0.053	0
Isolamento da fêmea pré-parturiente	2.563	0.284 : 124.313	0.667	0.957
Partilha de pastagem	5.545	1.572 : 25.266	0.003	0.826
Contacto do rebanho com outros efetivos	3.066	0.606 : 30.447	0.209	0.913
Contacto do rebanho com espécies silváticas	Inf	1.416 : Inf	0.015	1
Cães têm contacto próximo com o rebanho	Inf	2.278 : Inf	0.001	1
Irregularidades sanitárias	6.355	1.821 : 24.017	0.002	0.478

Notas: OR – Odds-ratio; Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Tabela 17. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações duvidosas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.

Variáveis	OR	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p	Proporção
Tamanho do rebanho	1.028	0.145 : 5.920	1	0.375
Presença de ovinos	Inf	0.433 : Inf	0.341	1
Presença de ovinos de leite	0	0 : 276.678	1	0
Presença de caprinos	0.576	0.052 : 3.612	0.702	0.250
Rebanho misto	2.015	0.171 : 14.244	0.598	0.250
% de machos no efetivo	Inf	0.224 : Inf	0.581	1
% de adultos no efetivo	7.550	0.089 : 634.810	0.233	0.125
% de animais de reposição	0.966	0.163 : 5.730	1	0.500
% de animais vacinados	Inf	0.152 : Inf	1	1
% de animais eID* no efetivo	0	0 : 1.227	0.051	0
% de animais comprados	1.047	0.182 : 7.414	1	0.625
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m)**	24.443	2.657 : 348.633	0.001	0.500
Isolamento de animais infetados	Inf	0.004 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	0.787	0.071 : 5.007	1	0.250
Venda de animais (12 m)**	1.491	0.236 : 16.481	1	0.750
Partilha de reprodutores	0	0 : 3.804	0.587	0
Isolamento da fêmea pré-parturiente	Inf	0.152 : Inf	1	1
Partilha de pastagem	1.189	0.200 : 7.060	1	0.500
Contacto do rebanho com outros efetivos	0.499	0.083 : 3.638	0.395	0.625
Contacto do rebanho com espécies silváticas	2.049	0.227 : 100.236	0.675	0.875
Cães têm contacto próximo com o rebanho	0.772	0.133 : 5.517	0.706	0.625
Irregularidades sanitárias	0	0 : 5.332	0.583	0

Notas: OR – Odds-ratio; Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Tabela 18. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o grupo das explorações duvidosas.

Variáveis	OR	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p	Proporção
Tamanho do rebanho	7.257	0.971 : 69.043	0.027	0.826
Presença de ovinos	0	0 : 15.772	1	0.913
Presença de ovinos de leite	0	0 : Inf	1	0
Presença de caprinos	2.665	0.369 : 32.456	0.412	0.478
Rebanho misto	1.890	0.257 : 23.193	0.676	0.391
% de machos no efetivo	0	0 : 111.931	1	0.957
% de adultos no efetivo	1.048	0.070 : 62.875	1	0.130
% de animais de reposição	4.466	0.576 : 38.046	0.154	0.826
% de animais vacinados	0	0 : 111.931	1	0.957
% de animais eID* no efetivo	Inf	0.139 : Inf	0.550	0.130
% de animais comprados	1.357	0.164 : 9.557	1	0.696
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m)**	9.426	0.987 : 138.989	0.026	0.913
Isolamento de animais infetados	0	0 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	1.057	0.132 : 13.494	1	0.261
Venda de animais (12 m)**	6.747	0.304 : 450.036	0.156	0.957
Partilha de reprodutores	0	0 : Inf	1	0
Isolamento da fêmea pré-parturiente	0	0 : 111.931	1	0.957
Partilha de pastagem	4.466	0.576 : 38.046	0.154	0.826
Contacto do rebanho com outros efetivos	5.828	0.524 : 88.195	0.093	0.913
Contacto do rebanho com espécies silváticas	Inf	0.074 : Inf	0.258	1
Cães têm contacto próximo com o rebanho	Inf	1.386 : Inf	0.012	1
Irregularidades sanitárias	Inf	1.179 : Inf	0.028	0.478

Notas: OR – Odds-ratio; Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Tabela 19. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o grupo das explorações positivas e como explorações controlo o conjunto das explorações negativas e duvidosas.

Variáveis	OR	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p	Proporção
Tamanho do rebanho	7.916	2.272 : 35.785	< 0.05	0.826
Presença de ovinos	2.601	0.517 : 25.725	0.336	0.913
Presença de ovinos de leite	0	0 : 110.030	1	0
Presença de caprinos	1.664	0.567 : 4.877	0.326	0.478
Rebanho misto	3.476	1.037 : 11.747	0.036	0.391
% de machos no efetivo	3.057	0.372 : 143.055	0.436	0.957
% de adultos no efetivo	4.623	0.493 : 59.037	0.110	0.130
% de animais de reposição	4.532	1.308 : 20.336	0.013	0.826
% de animais vacinados	2.220	0.247 : 107.469	0.671	0.957
% de animais eID* no efetivo	0.341	0.058 : 1.353	0.166	0.130
% de animais comprados	1.423	0.471 : 4.692	0.616	0.696
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m)**	92.196	16.983 : 976.545	< 0.05	0.913
Isolamento de animais infetados	Inf	0.009 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	0.856	0.239 : 2.741	1	0.261
Venda de animais (12 m)**	10.307	1.459 : 452.665	0.010	0.957
Partilha de reprodutores	0	0 : 1.362	0.105	0
Isolamento da fêmea pré-parturiente	2.220	0.247 : 107.469	0.671	0.957
Partilha de pastagem	5.439	1.570 : 24.430	0.003	0.826
Contacto do rebanho com outros efetivos	3.390	0.695 : 33.014	0.138	0.913
Contacto do rebanho com espécies silváticas	Inf	1.337 : Inf	0.017	1
Cães têm contacto próximo com o rebanho	Inf	2.402 : Inf	0.001	1
Irregularidades sanitárias	7.363	2.123 : 27.673	< 0.05	0.478

Notas: OR – Odds-ratio; Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Tabela 20. Resultados do teste de Fisher e análise do Odds-ratio às variáveis independentes. Ao nível da variável de resposta categórica, foram consideradas como explorações caso o conjunto das explorações positivas e duvidosas e como explorações controlo o grupo das explorações negativas.

Variáveis	OR	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p	Proporção
Tamanho do rebanho	4.118	1.493 : 12.206	0.003	0.710
Presença de ovinos	4.226	0.858 : 41.350	0.074	0.935
Presença de ovinos de leite	0	0 : 71.631	1	0
Presença de caprinos	1.235	0.457 : 3.305	0.654	0.419
Rebanho misto	3.317	1.041 : 11.088	0.029	0.355
% de machos no efetivo	4.831	0.597 : 224.223	0.151	0.968
% de adultos no efetivo	8.093	0.754 : 414.664	>0.05	0.129
% de animais de reposição	2.744	0.981 : 8.341	0.042	0.742
% de animais vacinados	3.489	0.394 : 167.536	0.414	0.968
% de animais eID* no efetivo	0.201	0.035 : 0.780	0.011	0.097
% de animais comprados	1.316	0.482 : 3.750	0.646	0.677
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m)**	102.251	19.073 : 1090.219	<0.05	0.806
Isolamento de animais infetados	Inf	0.014 : Inf	1	1
Compra de animais (12 m)**	0.820	0.263 : 2.397	0.807	0.258
Venda de animais (12 m)**	4.596	1.181 : 26.597	0.019	0.903
Partilha de reprodutores	0	0 : 0.858	0.024	0
Isolamento da fêmea pré-parturiente	3.489	0.394 : 167.536	0.414	0.968
Partilha de pastagem	3.379	1.208 : 10.295	0.013	0.742
Contacto do rebanho com outros efetivos	1.529	0.446 : 6.121	0.584	0.839
Contacto do rebanho com espécies silváticas	8.708	1.188 : 388.297	0.016	0.968
Cães têm contacto próximo com o rebanho	4.246	1.085 : 24.648	0.034	0.903
Irregularidades sanitárias	3.860	1.175 : 13.592	0.014	0.355

Notas: OR – Odds-ratio; Proporção - proporção de explorações com presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * animais eletronicamente identificados; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Anexo VI – Testes de sensibilidade para categorização das variáveis quantitativas em estudo

Tabela 21. Comparação da significância dos níveis de categorização das variáveis quantitativas, para melhor diferenciação entre explorações positivas e negativas.

Variáveis	Níveis	OR	IC (95%)	p	Proporção
Idade do proprietário	> 55 ^A	0.551	0.205 : 1.457	0.258	0.484
	<= 55				
	> 65 ^A	1	NA	NA	0.161
	50 a 65	0.659	0.182 : 2.087	0.571	0.516
	< 50	0.380	0.092 : 1.417	0.197	0.323
	> 58 ^A	0.499	0.180 : 1.327	0.179	0.355
	<= 58				
	> 60 ^A	0.492	0.168 : 1.350	0.172	0.290
	<= 60				
Tamanho do rebanho	> 100 ^A	1	NA	NA	0.419
	51 a 100	1.081	0.313 : 3.750	1	0.290
	10 a 50	3.934	1.314 : 12.584	0.015	0.258
	< 10	5.621	0.764 : 161.093	0.104	0.032
	> 122 ^A	1	NA	NA	0.355
	22 a 122	1.793	0.628 : 5.186	0.297	0.516
	< 22	4.031	1.059 : 18.338	0.055	0.129
	> 75 ^A	4.175	1.515 : 12.021	0.003	0.581
	<= 75				
	> 47 ^A	4.833	1.715 : 14.900	0.002	0.742
	<= 47				
	> 50 ^A	4.118	1.493 : 12.206	0.003	0.710
	<= 50				
	> 100 ^A	2.675	0.931 : 7.841	0.049	0.419
	<= 100				
% de machos no efetivo	> 10%	4.831	0.597 : 224.223	0.151	0.968
	<= 10% ^A				
	> 6.25%	4.031	1.059 : 18.338	0.055	0.129
	2.56 a 6.25%	1.793	0.628 : 5.186	0.297	0.516
	< 2.56% ^A	1	NA	NA	0.355
	> 5.38%	2.067	0.672 : 7.227	0.218	0.806
	<= 5.38% ^A				
	> 4.04%	1.641	0.625 : 4.407	0.372	0.581
	<= 4.04% ^A				
	Ausência ♂ ^A	0.915	0.078 : 6.830	1	0.065
	Presença ♂				

Tabela 21 (continuação)

Variáveis	Níveis	OR	IC (95%)	p	Proporção
% de adultos no efetivo	> 95% ^A	0.170	0.003 : 2.230	0.123	0.903
	<= 95%				
	> 99.69% ^A	0.124	0.002 : 1.326	0.050	0.871
	<= 99.69%				
	<= 85% ^A	0	0 : Inf	1	0.000
	> 85%				
	< 100% ^A	8.093	0.754 : 414.664	0.050	0.129
	100%				
% de animais de reposição no efetivo	> 10% ^A	2.161	0.660 : 7.127	0.171	0.290
	<= 10%				
	> 15% ^A	1.414	0.193 : 9.006	0.693	0.097
	<= 15%				
	> 25% ^A	0.918	0.015 : 18.317	1	0.032
	<= 25%				
	> 3% ^A	2.158	0.816 : 5.897	0.118	0.613
	<= 3%				
	> 6.5% ^A	1.438	0.528 : 3.891	0.490	0.419
	<= 6.5%				
	Presença ^A	2.744	0.981 : 8.341	0.042	0.742
	Ausência				
% de animais vacinados no efetivo	< 30% ^A	1	NA	NA	0.194
	30 a 60%	0.261	0.080 : 0.753	0.013	0.613
	> 60%	0.488	0.123 : 1.917	0.316	0.194
	< 20% ^A	1	NA	NA	0.129
	20 a 55.02%	0.366	0.090 : 1.201	0.160	0.581
	> 55.02%	0.354	0.078 : 1.380	0.185	0.290
	< 39.08% ^A	0.499	0.180 : 1.327	0.179	0.355
	>= 39.08%				
	< 41.23% ^A	0.497	0.182 : 1.314	0.180	0.387
	>= 41.23%				
	< 80% ^A	Inf	0.508 : Inf	0.157	1.000
	>= 80%				
	< 70% ^A	3.489	0.394 : 167.536	0.414	0.968
	>= 70%				
% de animais eID* no efetivo	< 70% ^A	0.744	0.280 : 1.949	0.656	0.452
	>= 70%				
	< 59.09% ^A	1	NA	NA	0.097
	59.09 a 82.44%	0.241	0.049 : 0.854	0.028	0.613
	> 82.44%	0.255	0.046 : 1.072	0.088	0.290
	< 69.57% ^A	0.744	0.280 : 1.949	0.656	0.452
	>= 69.57%				
	< 70.03% ^A	0.744	0.280 : 1.949	0.656	0.452

Tabela 21 (continuação)

Variáveis	Níveis	OR	IC (95%)	p	Proporção
% de animais comprados no efetivo	>= 70.03%				
	< 60% ^A	0.201	0.035 : 0.780	0.011	0.097
	>= 60%				
	> 30% ^A	1	NA	NA	0.032
	10 a 30%	0.331	0.011 : 2.570	0.382	0.258
	< 10%	0.315	0.012 : 2.097	0.407	0.710
	> 9.47% ^A	0.759	0.257 : 2.128	0.640	0.290
	<= 9.47%				
	> 3.75% ^A	0.744	0.280 : 1.949	0.656	0.452
	<= 3.75%				
	Compra ^A	1.316	0.482 : 3.750	0.646	0.677
	Não compra				

Nota: Níveis – níveis de categorização considerados; A – nível considerado de risco para BPR; OR – *Odds-ratio*; IC – intervalo de confiança; Proporção - proporção de explorações com a presença do fator de risco e de doença, simultaneamente; * identificados eletronicamente.

Anexo VII – Fatores de risco e níveis considerados para as variáveis em estudo

Tabela 22. Especificação dos níveis e fatores de risco das variáveis significativas ao teste de Fisher e variáveis quantitativas categorizadas em qualitativas, agrupados por classificação de BPR do presente estudo. Critérios utilizados na categorização das variáveis quantitativas em qualitativas.

Variáveis	Níveis da variável	n (positivas)	n (negativas)	Critério de divisão
Tamanho do rebanho	> 50 ^A	21	22	Média aproximada
	<= 50	36	9	
Idade do proprietário	> 60 ^A	26	9	Média aproximada
	<= 60	31	22	
Presença de ovinos	Sim ^A	44	29	
	Não	13	2	
Presença de ovinos leiteiros	Sim ^A	1	0	
	Não	56	31	
Presença de caprinos	Sim ^A	21	13	
	Não	36	18	
Rebanho misto	Sim ^A	8	11	Mais que uma espécie
	Não	49	20	
% de machos no efetivo	> 10%	8	1	Proporção ♂:♀ < 1:10 ¹
	<= 10% ^A	49	30	
% de adultos no efetivo	< 100% ^A	1	4	Rebanho apenas com adultos ou não
	100%	56	27	
% de animais de reposição no efetivo	Presença ^A	29	23	
	Ausência	28	8	
% de vacinados no efetivo	< 70% ^A	51	30	% de boa cobertura ²
	>= 70%	6	1	
% de animais eID ³ no efetivo	< 60% ^A	20	3	% de boa cobertura ²
	>= 60%	37	28	
% de animais comprados no efetivo	Compra ^A	35	21	Presença ou ausência
	Não compra	22	10	
Proprietário reconhece BPR no efetivo (12 m) ⁴	Sim ^A	2	25	
	Não	55	6	
Isolamento de animais infetados	Não ^A	56	31	
	Sim	1	0	
Compra de animais (12 m) ⁴	Sim ^A	17	8	
	Não	40	23	
Venda de animais (12 m) ⁴	Sim ^A	38	28	
	Não	19	3	
Partilha de reprodutores	Sim ^A	9	0	

Tabela 22 (continuação)

Variáveis	Níveis da variável	n (positivas)	n (negativas)	Critério de divisão
	Não	48	31	
Isolamento da fêmea pré-parturiente	Não ^A	51	30	
	Sim	6	1	
Partilha de pastagem	Sim ^A	26	23	
	Não	31	8	
Contacto do rebanho com outros efetivos	Sim ^A	44	26	
	Não	13	5	
Contacto do rebanho com espécies silváticas	Sim ^A	44	30	
	Não	13	1	
Cães têm contacto próximo com o rebanho	Sim ^A	39	28	
	Não	18	3	
Irregularidades sanitárias	Sim ^A	7	11	
	Não	50	20	

Notas: A – fator de risco considerado para a variável; 1 – proporção de machos para fêmeas; 2 – definido pragmaticamente; 3 – eletronicamente identificados; 4 – nos 12 meses anteriores ao IE.

Anexo VIII – Comparação entre modelos de regressão logística e seleção do modelo explicativo

As variáveis que apresentavam relações estatisticamente significativas com a classificação de BPR dos efetivos de pequenos ruminantes na análise univariada (teste de Fisher e *Odds-ratio*) foram incluídas num modelo de regressão logística (Tabela 23). Neste modelo verificamos que apenas uma variável – *proprietário reconhece casos de BPR no seu efetivo nos 12 meses anteriores ao IE* – apresenta uma relação estatisticamente significativa com a ocorrência de infeção no rebanho ($p < 0,05$), contudo esta variável não permite, do ponto de vista epidemiológico ou biológico, descrever o risco de transmissão de BPR entre rebanhos. Por este motivo, é legítimo remover esta variável do modelo (Petrie & Watson, 2013).

Tabela 23. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo completo, contemplando as variáveis significativas ao teste de Fisher e Odds-ratio.

Variáveis	Parâmetros de regressão logística			
	β	SE	Valor de Z	Valor de p
(Ordenada na origem)	-3.987	1.518	-2.627	0.009
Tamanho do rebanho	0.027	0.897	0.030	0.976
Rebanho misto	-0.318	1.071	-0.297	0.766
Proprietário reconhece BPR (12 m)**	4.817	1.040	4.630	< 0.05
Venda de animais (12 m)**	1.293	1.237	1.045	0.296
Partilha de pastagem	-0.004	0.928	-0.005	0.996
Contacto com espécies silváticas	1.235	1.489	0.829	0.407
Cães têm contacto próximo com o rebanho	-0.482	1.028	-0.468	0.640
Irregularidades sanitárias	0.235	1.089	0.216	0.829

Notas: β - estimativa; SE – erro-padrão; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Assim sendo, obteve-se um modelo global reduzido, no qual apenas uma variável contribuía para a explicação da diferença entre explorações positivas e negativas ($p < 0,05$) (Tabela 24). Por este motivo e com o intuito de obter a melhor combinação de variáveis no modelo explicativo, recorreu-se à estratégia de redução de modelos por eliminação regressiva (Petrie & Watson, 2013).

Tabela 24. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo global, contemplando as variáveis cujo sentido epidemiológico poderia justificar a presença de risco para a transmissão de BPR.

Variáveis	Parâmetros de regressão logística			
	β	SE	Valor de Z	Valor de p
(Ordenada na origem)	-3.779	1.209	-3.125	0.002
Tamanho do rebanho	1.152	0.590	1.954	0.051
Rebanho misto	0.539	0.626	0.860	0.390
Venda de animais (12 m)**	0.656	0.814	0.807	0.420
Partilha de pastagem	0.670	0.614	1.090	0.276
Contacto com espécies silváticas	1.310	1.214	1.079	0.281
Cães têm contacto próximo com o rebanho	-0.037	0.844	-0.044	0.965
Irregularidades sanitárias	1.481	0.657	2.255	0.024

Notas: β – estimativa; SE – erro-padrão; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Desta forma, obteve-se um terceiro modelo (Tabela 25). As variáveis incluídas no modelo resultante da estratégia de redução por eliminação regressiva apresentavam coeficientes significativos na análise de regressão logística múltipla, relacionados com a ocorrência de infeção nos efetivos, após ajuste com as restantes variáveis de prognóstico (Tabela 25).

Tabela 25. Análise de regressão logística múltipla. Modelo explicativo resultante da estratégia de redução por eliminação regressiva, aplicada ao modelo reduzido.

Variáveis	Parâmetros de regressão logística			
	β	SE	Valor de Z	Valor de p
(Ordenada na origem)	-3.647	1.171	-3.115	0.002
Tamanho do rebanho	1.277	0.534	2.394	0.017
Partilha de pastagem	0.894	0.550	1.626	0.104
Contacto com espécies silváticas	1.636	1.168	1.401	0.161
Irregularidades sanitárias	1.434	0.637	2.254	0.024

Notas: β – estimativa; SE – erro-padrão; ** nos 12 meses antecedentes ao IE.

Com o intuito de selecionar o modelo mais adequado para a explicação das diferenças entre explorações positivas e negativas, comparou-se a qualidade dos mesmos através do seu valor do critério de informação de Akaike (AIC) e contabilizou-se o número de variáveis incluídas nos mesmos (Tabela 26) (Burnham & Anderson, 2002).

Assim sendo e tendo presente que o modelo completo não foi considerado, verificou-se que entre o modelo global (Tabela 24) e o terceiro modelo (Tabela 25) o AIC era inferior no último, que apresentava também um número inferior de variáveis de prognóstico (Tabela 26). Seguindo o princípio da parcimónia, deverá ser dada preferência ao terceiro modelo, por recorrer a um menor número de variáveis explicativas (Burnham & Anderson, 2002).

Adicionalmente, por comparação dos AIC dos modelos e recorrendo às seguintes fórmulas (Burnham & Anderson, 2002):

$$\Delta AIC = AIC_i - AIC_{min} ; L(g_i | x) \propto e^{\frac{(AIC_{min} - AIC_i)}{2}}$$

Onde: e = função exponencial;

AIC_{min} = valor de AIC para o “melhor” modelo (com AIC mais reduzido);

AIC_i = valor de AIC para o modelo em análise i .

podemos afirmar que há menor suporte empírico para a seleção do modelo global, pois a diferença relativa deste para o melhor modelo (terceiro modelo – que apresenta o valor de AIC mais reduzido) se situa entre 4 e 7. Por outro lado, verificamos que o modelo global apresenta uma probabilidade de minimizar a perda de informação (resultante da utilização de um modelo explicativo para representação da realidade) cerca de 0,11 vezes a do terceiro modelo (Burnham & Anderson, 2002). Os valores de ΔAIC e $L(g_i | x)$ calculados para o terceiro modelo resultam do facto de este se tratar do melhor modelo candidato do conjunto, uma vez que apresenta o valor de AIC mais reduzido de entre os modelos candidatos (Tabela 26).

Tabela 26. Comparação entre características dos modelos criados – número de variáveis, diferenças de AIC e plausibilidade de cada modelo em comparação com o melhor modelo candidato.

Modelo	Nº variáveis	AIC	ΔAIC	$L(g_i x)$
Completo	8	68.039	–	–
Global	7	105.67	4,34	0,11
Eliminação regressiva	4	101.33	0	1

Pelos motivos expostos, foi selecionado, para este estudo, o terceiro modelo para a explicação das diferenças entre explorações positivas e negativas, quanto à ocorrência de BPR nos efetivos (Tabela 25).

Anexo IX – Registo fotográfico da execução das atividades de campo do PEBPR, fatores de risco para a BPR e maneio das explorações

Figura 21. Registo fotográfico de uma incorreta aplicação da vacina Rev.1; a gota foi aplicada na pálpebra do animal enquanto o proprietário fazia a sua contenção sem material de proteção pessoal (imagens próprias).



Figura 22. Registo fotográfico da tipologia de curral mais comum da amostra de explorações analisadas; note-se o contacto com cães e a constituição mista do rebanho (imagens próprias).



Figura 23. Registo fotográfico de uma tipologia de curral observada e menos comum na amostra de explorações analisadas – pavilhão (imagens próprias).



Figura 24. Registo fotográfico de uma tipologia de curral observada e menos comum na amostra de explorações analisadas – instalações rudimentares; note-se o contacto com cães (imagens próprias).



Figura 25. Registro fotográfico de um exemplo de más condições higiênicas no curral; note-se a acumulação de dejetos devido à sua não remoção (imagens próprias).



Figura 26. Registro fotográfico de uma fêmea com a sua cria recém-parida – possível contaminação do alimento do rebanho com o agente (imagens próprias).

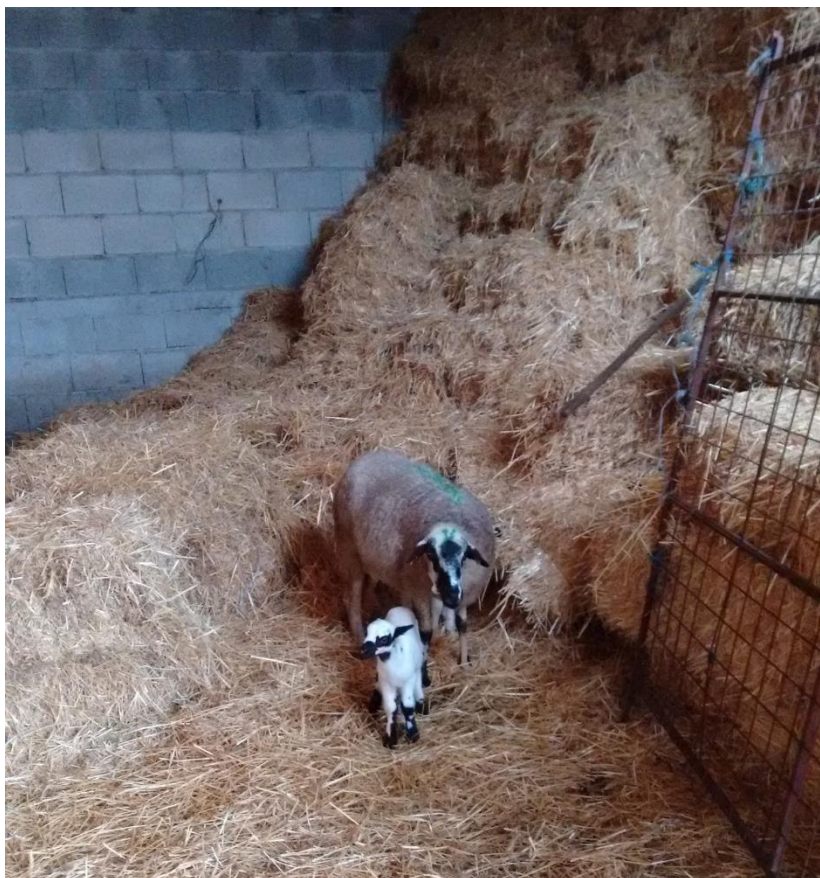


Figura 27. Registo fotográfico de um exemplo de uma fonte pública acessível e com frequência utilizada por diferentes espécies animais, entre estas os pequenos ruminantes da amostra analisada (imagens próprias).



Figura 28. Registo fotográfico de um dos casos observados de consumo de secundinas por parte dos cães das explorações visitadas (imagens próprias).



Figura 29. Registro fotográfico de um dos casos observados de consumo de pequenos ruminantes mortos por parte dos cães das explorações visitadas (imagens próprias).

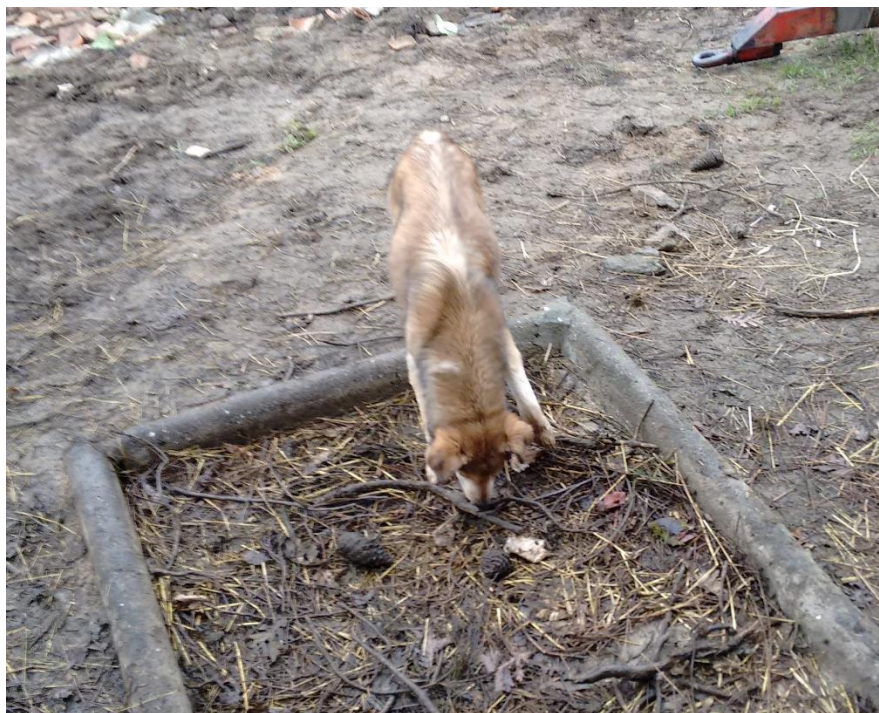


Figura 30. Registro fotográfico evidenciando parte de um osso de pequeno ruminante do qual o cão fotografado na Figura 26 se alimentava (imagens próprias).



Figura 31. Registro fotográfico de uma aplicação da vacina Rev.1 perante a ausência de uso de material de proteção pessoal por parte da pessoa que fazia a contenção do animal (imagens próprias).



Figura 32. Registro fotográfico de um caso observado de ingestão de fezes de pequenos ruminantes, por parte de um cão da mesma exploração (imagens próprias).



Anexo X – Mapas dos concelhos com explorações visitadas

Figura 33. Mapa do concelho de Chaves e suas freguesias (Gazilion, 2014b).

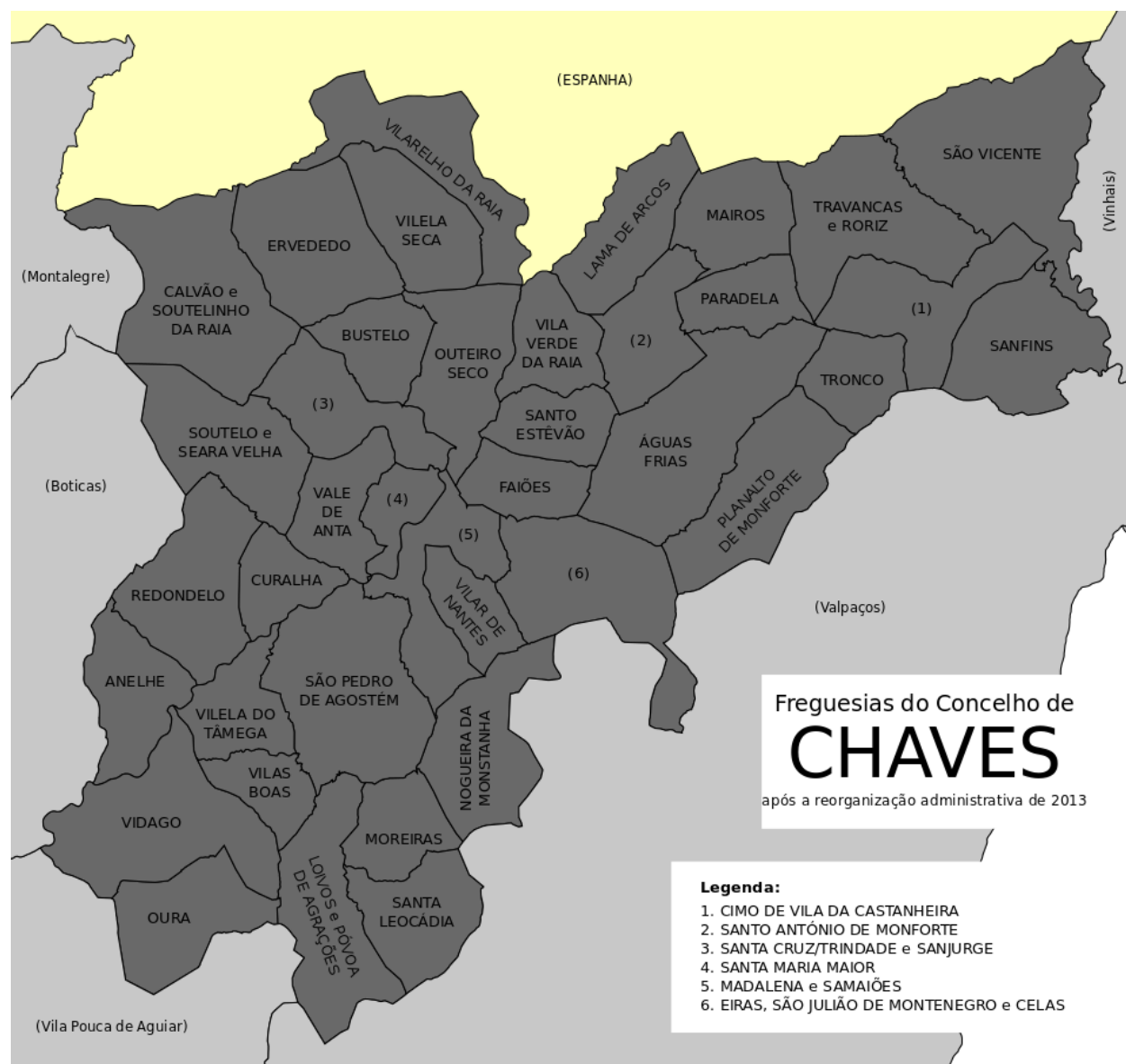


Figura 34. Mapa do concelho de Valpaços e suas freguesias (Gazilion, 2014c).

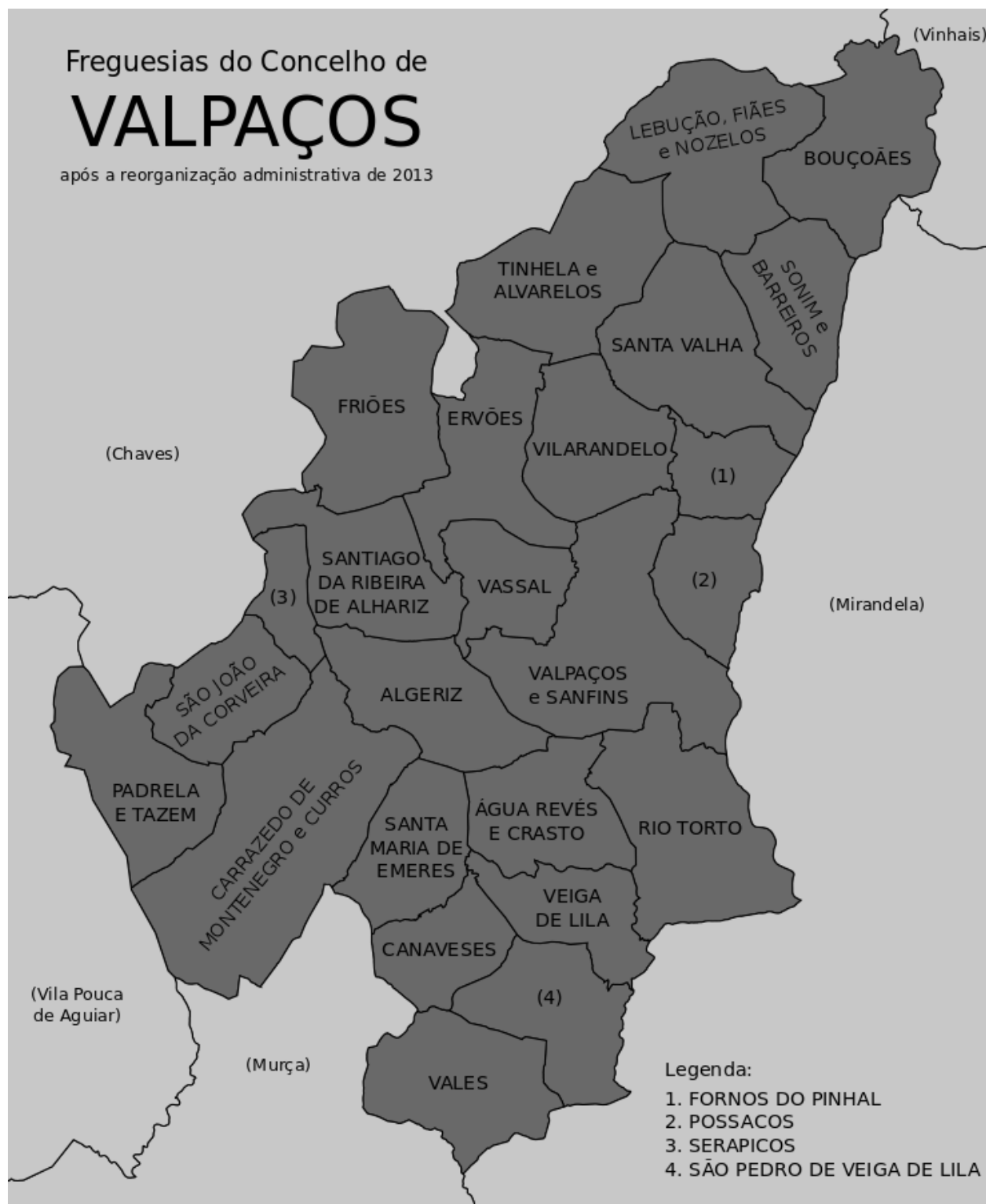


Figura 35. Mapa do concelho de Boticas e suas freguesias (Gazilion, 2014a).



Anexo XI – Distribuição das explorações visitadas por freguesia

Tabela 27. Distribuição da amostra de explorações visitadas por freguesia, agrupadas de acordo com a sua classificação de BPR do estudo.

Concelho	Freguesia	Classificação de BPR	Número de explorações	Percentagem de explorações
Boticas				
	Ardãos	Negativas	1	100
	Sapiãos	Positivas	1	100
Total - Boticas				
		Negativas	1	50
		Positivas	1	50
Chaves				
	Águas Frias	Negativas	5	100
	Arcossó	Negativas	2	100
	Calvão	Negativas	2	100
	Cela	Negativas	1	100
	Cimo de Vila de Castanheira	Negativas	1	20
		Positivas	4	80
	Eiras	Negativas	1	100
	Ervededo	Negativas	3	100
	Faiões	Negativas	1	50
		Positivas	1	50
	Lama de Arcos	Negativas	3	100
	Madalena	Negativas	2	100
	Mairos	Negativas	1	100
	Moreiras	Negativas	1	100
	Nogueira da Montanha	Negativas	2	100
	Oucidres	Negativas	2	66.67
		Positivas	1	33.33
	Outeiro Seco	Negativas	1	50
		Positivas	1	50
	Paradela	Positivas	2	100
	Póvoa de Agrações	Negativas	3	100
	Redondelo	Negativas	1	33.33
		Positivas	2	66.67
	Roriz	Negativas	1	100
	Samaiões	Negativas	3	100

Tabela 27 (continuação)

Concelho	Freguesia	Classificação de BPR	Número de explorações	Percentagem de explorações
	Sanfins	Negativas	1	100
	Santa Maria Maior	Positivas	1	100
	Santo António de Monforte	Negativas	1	100
	Santo Estêvão	Negativas	1	50
		Positivas	1	50
	São Pedro de Agostém	Negativas	7	70
		Positivas	3	30
	São Vicente	Negativas	4	57.14
		Positivas	3	42.86
	Soutelo	Negativas	1	100
	Travancas	Negativas	1	50
		Positivas	1	50
	Tronco	Negativas	1	100
	Vale de Anta	Negativas	2	100
	Vidago	Negativas	1	100
	Vila Verde da Raia	Positivas	1	100
	Vilar de Nantes	Positivas	1	100
	Vilarinho das Paranhos	Positivas	1	100
	Vilela do Tâmega	Positivas	1	100
Total - Chaves				
		Negativas	56	70
		Positivas	24	30
Valpaços				
	Carracedo de Montenegro	Positivas	2	100
	Ervões	Positivas	2	100
	Santiago da Ribeira de Alhariz	Positivas	1	100
	Serapicos	Positivas	1	100
Total - Valpaços				
		Negativas	0	0
		Positivas	6	100

Anexo XII – Resultados complementares da análise das variáveis quantitativas

Com o intuito de comparar as características das explorações, correspondentes às variáveis quantitativas, entre os diferentes grupos de classificação de BPR das explorações, recorreu-se ao teste-T de Student (Tabela 28). Contudo, não foi possível validar os resultados significativos ($p < 0,05$) para este teste, pelo facto de não cumprirem as premissas do mesmo, uma vez que as variáveis em questão não apresentavam distribuição normal entre ambos os grupos (grupo das explorações negativas e grupo das explorações positivas) simultaneamente, conforme verificado através da realização do teste de Shapiro-Wilk (Tabela 29).

Do conjunto das variáveis quantitativas, apenas a idade do proprietário e a percentagem de animais eletronicamente identificados no rebanho apresentavam distribuição normal (Tabela 29, Figura 37 e Figura 36), no entanto estas variáveis não apresentavam diferenças significativas para as médias entre os grupos de diferente classificação de BPR do estudo (Tabela 28).

Assim sendo, recorreu-se, como alternativa não paramétrica ao teste-T de Student, ao teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, por forma a determinar a existência de diferentes distribuições, com diferentes medianas, entre os grupos de classificação positiva e negativa. Verificou-se que tal acontecia para o tamanho do rebanho (Tabela 29).

Tabela 28. Resultados do teste-T de Student aplicado às variáveis quantitativas.

	Teste-T de Student		
Variáveis quantitativas	Média	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
Tamanho do rebanho			
Negativas	59,333	-78,773 : -12,367	0,008
Positivas	104,903		
Idade do proprietário			
Negativas	59,193	-0,712 : 9,873	0,089
Positivas	54,613		
% de animais de reposição			
Negativas	5,128	-10,799 : 3,129	0,272
Positivas	8,963		
% de ovinos de carne no efetivo			
Negativas	74,123	-31,137 : -2,241	0,024
Positivas	90,812		

Tabela 28 (continuação)

Variáveis quantitativas	Teste-T de Student		
	Média	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
% de ovinos de leite no efetivo			
Negativas	0,159	-0,160 : 0,479	0,322
Positivas	0		
% de caprinos no efetivo			
Negativas	25,717	2,065 : 30,994	0,026
Positivas	9,188		
% de machos no efetivo			
Negativas	6,127	0,252 : 3,966	0,027
Positivas	4,018		
% de animais eID** no efetivo			
Negativas	67,815	-12,438 : 2,466	0,187
Positivas	72,801		
% de animais comprados			
Negativas	10,401	-2,733 : 8,008	0,331
Positivas	7,763		
% de animais vacinados			
Negativas	36,230	-17,770 : 1,581	0,100
Positivas	44,325		

Notas: ** Identificados eletronicamente.

Tabela 29. Resultados dos testes de Shapiro-Wilk e de Wilcoxon-Mann-Whitney aplicados às variáveis quantitativas.

	Teste de Shapiro-Wilk		Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	
Variáveis quantitativas	W	Valor de p	W	Valor de p
Tamanho do rebanho				
Negativas	0,789	< 0,05	542,5	0,003
Positivas	0,903	0,008		
Idade do proprietário				
Negativas	0,980	0,462	1080	0,087
Positivas	0,986	0,941		
% de animais de reposição				
Negativas	0,559	< 0,05	673,5	0,058
Positivas	0,450	< 0,05		

Tabela 29 (continuação)

	Teste de Shapiro-Wilk		Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	
Variáveis quantitativas	W	Valor de p	W	Valor de p
% de ovinos de carne no efetivo				
Negativas	0,592	< 0,05	837	0,648
Positivas	0,396	< 0,05		
% de ovinos de leite no efetivo				
Negativas	—	—	899	0,475
Positivas	—	—		
% de caprinos no efetivo				
Negativas	0,587	< 0,05	911	0,787
Positivas	0,396	< 0,05		
% de machos no efetivo				
Negativas	0,743	< 0,05	1069,5	0,105
Positivas	0,860	0,001		
% de animais eID** no efetivo				
Negativas	0,960	0,058	745	0,228
Positivas	0,967	0,430		
% de animais comprados				
Negativas	0,753	< 0,05	921,5	0,737
Positivas	0,742	< 0,05		
% de animais vacinados				
Negativas	0,953	0,027	694	0,099
Positivas	0,949	0,149		

Notas: ** Identificados eletronicamente.

Figura 37. Gráfico quantil-quantil da variável 'idade do proprietário'.

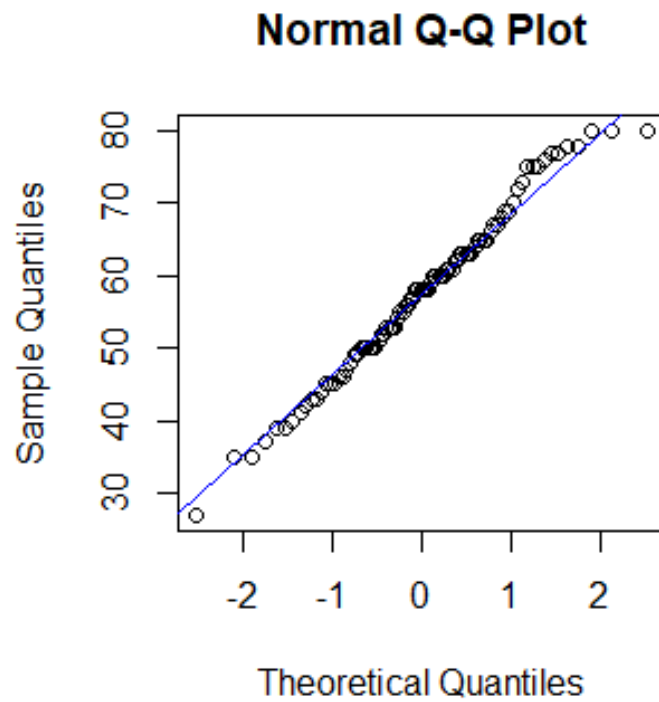
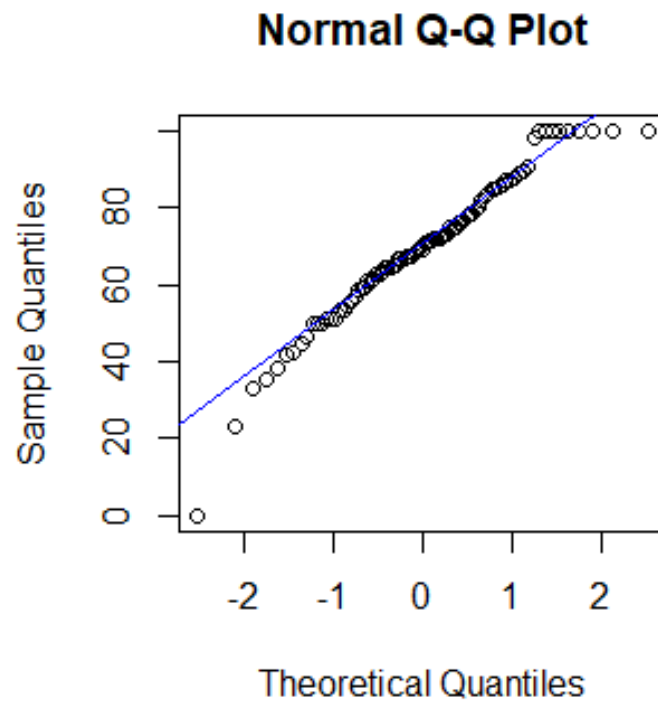


Figura 36. Gráfico quantil-quantil da variável 'percentagem de animais identificados eletronicamente no rebanho'.



No sentido de averiguar a existência de uma associação entre certas variáveis em estudo com o tamanho do rebanho, procedeu-se à comparação das médias do tamanho do rebanho entre diferentes grupos de explorações. Assim sendo, foi realizada a comparação das médias dos tamanhos dos rebanhos entre: o grupo de explorações que tinham vendido animais vivos nos 12 meses anteriores ao IE e o grupo que não tinha vendido animais vivos nesse período; o grupo de explorações que tinha cães presentes na exploração e o grupo das explorações nas quais estes animais não existiam; o grupo de explorações nas quais os cães contactavam proximamente com o rebanho e o grupo de explorações em que não existia contacto próximo entre estas duas espécies. De igual forma, esta comparação foi realizada com recurso ao teste-T de Student (Tabela 30).

Novamente, não foi possível validar os resultados significativos ($p < 0,05$) para o teste-T de Student, uma vez que não se verificava o cumprimento das premissas do mesmo. Nomeadamente, as variáveis em questão não apresentavam distribuição normal entre ambos os grupos (por exemplo, grupo das explorações com presença de cães e grupo das explorações sem cães) simultaneamente, conforme verificado através da realização do teste de Shapiro-Wilk (Tabela 31).

Pelos motivos expostos, recorreu-se, como alternativa não paramétrica ao teste-T de Student, ao teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, com o intuito de determinar a existência de diferentes distribuições, com diferentes medianas, entre os grupos das variáveis. Verificou-se que tal acontecia para a venda de animais vivos nos 12 meses anteriores ao IE, presença de cães na exploração e contacto próximo entre o rebanho e os cães da exploração (Tabela 31).

Tabela 30. Resultados do teste-T de Student, aplicado à variável 'tamanho do rebanho', considerando grupos de explorações de acordo com certas variáveis em estudo.

Variáveis	Teste-T de Student		
	Média	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
Venda de animais vivos nos últimos 12 meses			
Não venderam	46,364	-69,376 : -8,018	0,015
Venderam	85,061		
Presença de cães na exploração			
Ausência de cães	25,333	-74,965 : -32,466	< 0,05
Presença de cães	79,049		
Cães têm contacto próximo com o rebanho			
Ausência de contacto	31,429	-82,265 : -33,206	< 0,05
Contacto próximo	89,164		

Tabela 31. Resultados dos testes de Shapiro-Wilk e de Wilcoxon-Mann-Whitney aplicados à variável 'tamanho do rebanho', considerando grupos de explorações de acordo com certas variáveis em estudo.

Variáveis	Teste de Shapiro-Wilk		Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	
	W	Valor de p	W	Valor de p
Venda de animais vivos nos últimos 12 meses				
Não venderam	0,717	< 0,05	410	0,002
Venderam	0,855	< 0,05		
Presença de cães na exploração				
Ausência de cães	0,949	0,729	123,5	0,043
Presença de cães	0,853	< 0,05		
Cães têm contacto próximo com o rebanho				
Ausência de contacto	0,658	< 0,05	281,5	< 0,05
Contacto próximo	0,872	< 0,05		

Anexo XIII – Mapas de prevalência e incidência de BPR em Espanha (2015)

Figura 38. Representação geográfica dos valores de incidência de BPR em animais nas comarcas espanholas, no ano 2015 (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016a).

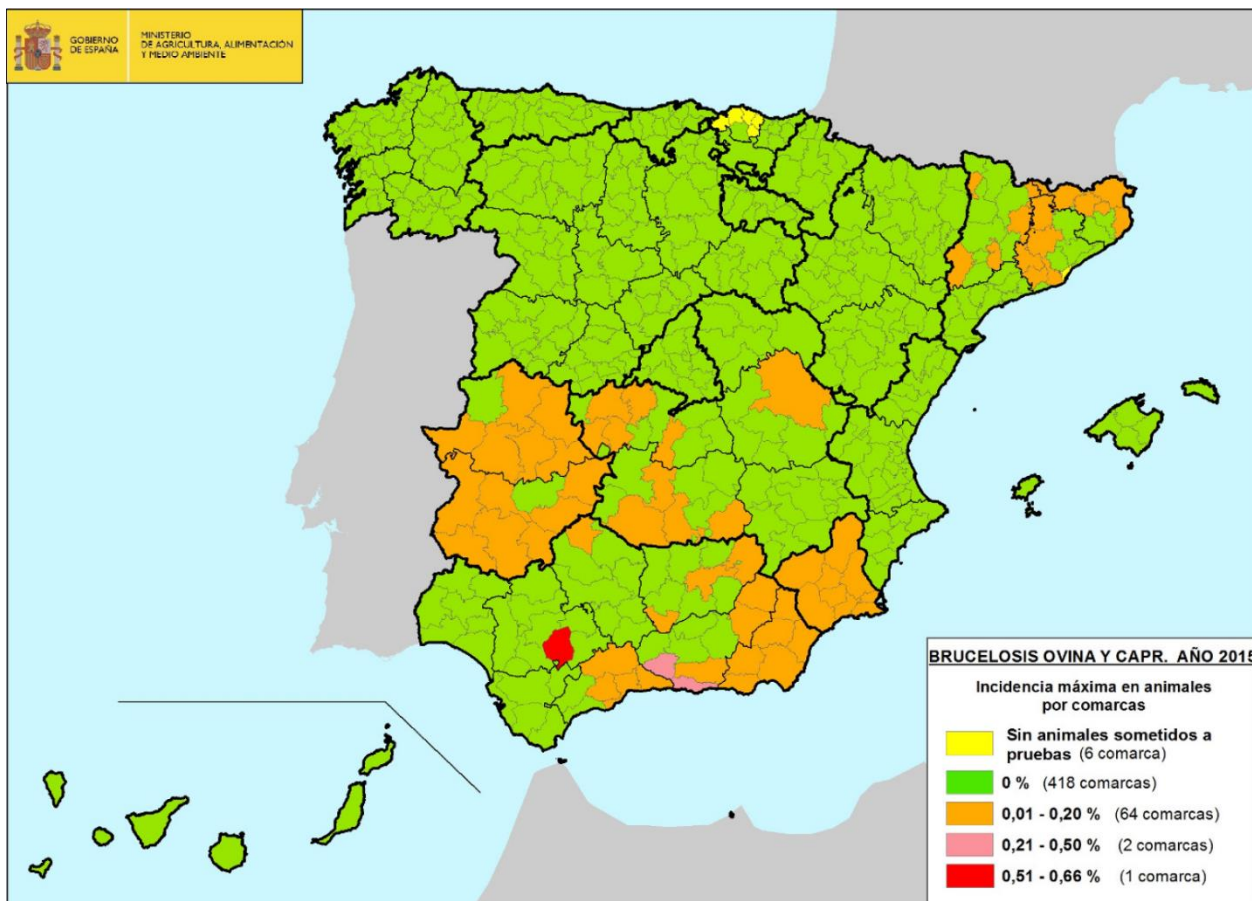


Figura 39. Representação geográfica dos valores de prevalência de BPR em rebanhos nas comarcas espanholas, no ano 2015 (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016b).

